

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Sección de Químicas.



TESIS DOCTORAL

**Interacción de antibióticos con el centro activo peptidil
transferasa del ribosoma eucariótico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Mariano, Barbacid

Madrid, 2015

T1
577.1
BAR

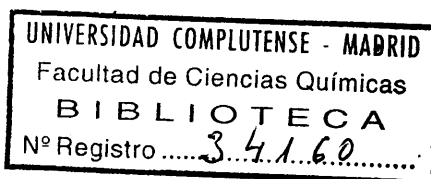


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322355150

INTERACCION DE ANTIBIOTICOS CON EL CENTRO
ACTIVO PEPTIDIL TRANSFERASA DEL RIBOSOMA
EUCARIOTICO.



TESIS presentada para optar al grado de
DOCTOR en CIENCIAS de la Universidad
de Madrid, por

MARIANO BARBACID MONTALBAN

Instituto de Biología Celular

Patronato Santiago Ramón y Cajal

C.S.I.C.

Madrid

Mi agradecimiento al Dr.D.Vázquez por la dirección de esta Tesis y al Prof.A.Municio por su presentación.

 Quiero expresar mi gratitud a todos mis compañeros de laboratorio, así como a las Srtas. R. Gutierrez y P.Ochoa por su excelente asistencia técnica y M.D.Puebla por su labor mecanográfica.

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|--|
| ANIS | Anisomicina |
| ATP | Adenosintrifosfato |
| Butil-PBD | 2- (4' terc-Butilfenil) -5 (4'' difenil) -1, 3,4 oxidiazol. |
| CACCA | (o abreviaturas similares) indica secuencia nucleotídica de un fragmento de RNA. La dirección 5' → 3' corresponde a la lectura de izquierda a derecha. |
| cpm | Pulsos de radioactividad detectados por minuto. |
| DAN | Desacetilanisomicina. |
| EDTA | Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético. |
| EF G | Factor de polimerización G (f. de translocación). |
| EF T | Factor de polimerización T (EF T _u + EF T _s). |
| EF T _u | EF T inestable (responsable de la fijación de aminoacil-tRNA). |
| EF T _s | EF T estable (responsable de la regeneración de EF T _u). |
| EF 1 | Factor de polimerización eucariótico (equiv. EF T). |
| EF 2 | Factor de polimerización eucariótico (equiv. EF G). |
| EtOH | Etanol |
| Fen. | Fenilalanina. |
| Fen-tRNA | Fenilalanil-tRNA |
| f-Met-tRNA _F | Formil metionil-tRNA, especie iniciadora. |
| GDP | Guanosin difosfato. |

| | |
|--|---|
| GDPCP | Guanosin difosfato-metilen-fosfato |
| GTP | Guanosin trifosfato |
| GOUG | Gougerotina |
| IF 1, IF 2 ó IF 3 | Factores de iniciación (procarióticos) |
| Isótopos radioactivos (³ H y ¹⁴ C) | Su utilización como prefijo indica el isótopo con que un compuesto se halla marcado. ¹² C indica el producto no marcado artificialmente. |
| L1,....., L34 | Proteínas ribosómicas de la subunidad mayor 50S. Nomenclatura del Dr. H. G. Wittman (Berlin). |
| Leu. | Leucina |
| N-Ac-Fen (ó Leu) | Fenilalanina (ó leucina) acetilada en su grupo amino. |
| poli U | Acido poliuridílico |
| PM | Puromicina |
| RF | Factor(es) de terminación |
| RNasa | Ribonucleasa |
| RNA | Acido ribonucleico |
| mRNA | mensajero |
| rRNA | ribosómico |
| tRNA | de transferencia |
| S (5S, 16S, 23S, 30S, 40S, 50S, 60S, 70S, 80S etc). | Partículas con un coeficiente de sedimentación en agua a 20°C de esas unidades Svedberg (S). |
| S1....., S21 | Proteínas ribosómicas de la subunidad menor 30S. Nomenclatura del Dr. H. G. Wittman (Berlin). |
| Soluciones tampón | Ver Apéndice I |
| S-100 | Extracto crudo de factores de polimerización |

| | |
|---------------------|-----------------------------------|
| tRNA ^{Fen} | tRNA específico para fenilalanina |
| TCA | Acido tricloroacético |
| TNA | Acido tenuazónico |
| TRIC | Tricodermina |
| TRIS | Tris (hidroximetil) amino metano. |

La nomenclatura empleada en los experimentos de fijación aparece en II.3.14.

INDICE

INTRODUCCION

CAPITULO I

| | |
|--------------------------------|----|
| Biosíntesis de proteínas | 1 |
| El ribosoma | 5 |
| Anisomicina | 27 |
| Gougerotina | 30 |
| Tricodermina | 33 |

MATERIALES Y METODOS

CAPITULO II

| | |
|----------------------------|----|
| Materiales | 40 |
| Métodos preparativos | 44 |
| Métodos analíticos | 69 |

RESULTADOS

CAPITULO III

| | |
|---|-----|
| Preparación de ^3H anisomicina | 86 |
| Preparación de ^3H gougerotina | 102 |
| Obtención de ^{14}C tricodermina | 113 |

CAPITULO IV

| | |
|--|-----|
| Fijación de ^3H anisomicina a ribosomas eucarióticos | 119 |
| Fijación de ^3H gougerotina a ribosomas | 148 |
| Fijación de ^{14}C tricodermina a ribosomas eucarióticos | 165 |

CAPITULO V

| | |
|-----------------------------|-----|
| Efecto de inhibidores | 173 |
|-----------------------------|-----|

DISCUSION

CAPITULO VI

| | |
|--------------------|-----|
| Discusión | 196 |
| BIBLIOGRAFIA | 213 |
| APENDICES | 228 |

CAPITULO I

I.1 BIOSINTESIS DE PROTEINAS

I.2 EL RIBOSOMA

I.3 ANISOMICINA
GOUGEROTINA
TRICODERMINA

1.1. BIOSINTESIS DE PROTEINAS

En 1971, la revisión de Lucas-Lenard y Lipmann presentó las bases de los conocimientos existentes acerca de como son sintetizadas las proteínas. Dadas las características del trabajo desarrollado en esta Tesis solo va a ser considerado en cierta profundidad la estructura ribosómica. No obstante en los esquemas representados en las figuras 1.1 y 2 se ha tratado de actualizar el máximo el mecanismo de biosíntesis de proteínas con los descubrimientos mas relevantes reportados desde 1971.

Por lo que respecta a los procesos de iniciación en bacterias, son los que han alcanzado un mayor grado de esclarecimiento. Hoy en día es admitido que los tres factores de iniciación (IF 1, IF 2 y IF 3) se unen a la subunidad 30S una vez que esta es separada de la 50S mediante la acción del factor de disociación (DF) cuya actividad ha sido identificada con IF 3 (Sabol y cols. 1970; Subramanian y Davis, 1970; Dubnoff y Maitra, 1971; Kaempfer, 1971; Grumber-Manago y cols. 1971; Vermeer y cols. 1971). Estas subunidades son capaces de fijar el RNA mensajero (Sabol y Ochoa, 1971; Dubnoff y Maitra, 1971) siendo también IF 3 responsable de esta actividad. La siguiente etapa consiste en la fijación de f-Met-tRNA_F dirigida por IF 2 y dependiente de GTP (Miller y Wahba, 1973; Groner y Revel, 1973; Benne, Ebes y Voorma, 1973) en contra de la anterior teoría acerca de la formación de un comple-

jo ternario f.Met·tRNA_F-GTP-IF 2 que posteriormente interaccionaba con la subunidad 30S (Rudland, Whybrow y Clark, 1971; Locwood, Chakraborty y Maitra, 1971; Benne y cols. 1973). Acoplada con esta fijación ha sido reportada la salida de IF 3 (Vermeer y cols. 1973). Una vez separado este factor (DF), la subunidad 50S puede interaccionar con el preexistente complejo de iniciación para dar un complejo 30S-50S-mRNA-GTP-f.Met·tRNA_F-IF 1-IF 2 que no es estable pues inmediatamente después tiene lugar la hidrólisis de GTP y la consiguiente salida de los factores IF 1 y IF 2 quedando el ribosoma en condiciones de fijar el primer aminoacil-tRNA e iniciar las etapas de polimerización. IF 1 abandona el complejo merced a la entrada de la subunidad 50S, mientras que para que lo haga IF 2 es necesario la previa salida de IF 1 así como la hidrólisis de GTP (Benne, Ebes y Voorma, 1973).

Por lo que respecta al crecimiento de la cadena polipeptídica (Fig. 1.2), se sigue admitiendo el modelo de Watson (1964) con la complementación que supuso el descubrimiento del mecanismo de acción de los factores EF G y EF T (EF T_u + EF T_s) (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biology, 1969). Dos han sido los avances mas notables realizados en este campo (a) Relación entre los sitios de fijación del factor EF G y el aminoacil-tRNA (sitio A) (Modolell y cols. 1971; Cabrer, Vázquez y Modolell, 1972; Modolell y Vázquez, 1973) y como consecuencia directa el solapamiento entre los sitios de fijación de EF G y EF T

sobre el ribosoma (Richman y Bodley, 1972; Miller, 1972; Richter, 1972 y Richter, 1973, en sistemas eucarióticos) (b) los cambios conformacionales, dependientes de la posición del peptidil-tRNA, que regulan la entrada alternativamente de los factores EF G y EF T (Modolell, Cabrer y Vázquez, 1973; Nombela y Ochoa, 1973). El mecanismo de las etapas de polimerización tras los datos aportados por todos estos autores ha quedado recogido en el esquema de la figura 1.2. Sin embargo ha de tenerse presente que si bien los sitios de fijación de EF G y EF T son exclusivos entre sí no son idénticos (Ballesta y Vázquez, 1972c). Análogas situaciones han sido reportadas para los otros factores capaces de catalizar la hidrólisis de GTP en las fases de iniciación (IF 2) (Benne, Ebes y Voorma, 1973) y de terminación (RF) (Tate, Beaudet y Caskey, 1973).

El proceso de terminación permanece prácticamente estacionario desde el Cold Spring Harb. Symp. on Quant. Biology (1969) y desde la revisión de Lucas-Lenard y Lipmann, (1971) tomada como referencia en esta breve Introducción, tan solo es digno de mención el solapamiento entre los factores de terminación y los de polimerización (Tate, Beaudet y Caskey, 1973) y el requerimiento de las proteínas L7 y L12 (ver 1.2.2) para la actividad GTPasa de estos factores (RF).

Finalmente la investigación del mecanismo de síntesis de proteínas en sistemas eucarióticos ha tomado un notable incremento desarrollándose un sin fin de sistemas acelula-

res que han permitido impulsar estas investigaciones. Sin embargo todas las etapas que han sido bien caracterizadas se corresponden en su totalidad con las descritas con anterioridad en sistemas bacterianos, con la única excepción de los resultados de Schreier y Staehelin (1973) que han detectado la formación de un complejo Met-tRNA_F-40S previo a la entrada del RNA mensajero. Estas observaciones se suman a las de Housman y cols. (1970) acerca de la existencia de un tRNA iniciador sin formilar que parece poner de manifiesto que es tan solo en la etapa de iniciación donde se encuentran las diferencias entre sistemas procarióticos y eucarióticos, si bien tales divergencias son siempre de pequeña envergadura.

La mayor parte de lo referido en este brevísimo apartado, aparecerá en la recopilación de Haselkorn y Rothman-Denes en el Annual Review of Biochemistry correspondiente al año 1973.

1.2. EL RIBOSOMA

1.2.1. INTRODUCCION

Pasando por alto las características estructurales mas señaladas que pueden ser encontradas en cualquier revisión publicada en los 5 últimos años, nos introduciremos en los hallazgos mas recientes que han provocado una visión completamente nueva de como actua un ribosoma. En este apartado nos referiremos al ribosoma E.coli, haciendo indicación especial si alguna referencia a ribosomas de B.stearotemophilus es introducida. Mediante la técnica de electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida desarrollada por Kaltschmidt y Wittmann (1970) han podido ser identificadas las 34 proteínas de la subunidad 50S y las 21 de la subunidad 30S adoptandose una nomenclatura común de acuerdo a sus movilidades electroforéticas (Wittmann y cols. 1971). Todas las proteínas ribosómicas son especies únicas y se hallan en un máximo de 1 copia por ribosoma (a excepción de L7 y L12). Esta categórica afirmación se basa en estudios preliminares de estructura primaria (péptidos trípticos) (Craven y cols. 1969; Mora y cols. 1971) y en que ninguna produce reacciones inmunológicas cruzadas (Stöffler y Wittmann, 1971a) habiendo sido muchas de ellas purificadas y caracterizadas en varios laboratorios (Traut y cols. 1969; Nomura y cols. 1969; Kurland y cols. 1969, además del ya descrito grupo de Wittmann).

Por lo que respecta a los rRNAs se han identificado

3 especies 23S y 5S RNA en la subunidad mayor y 16S RNA en la subunidad menor. El menor de ellos y genéticamente independiente (5S RNA) ha sido secuenciado por Brownlee, Sanger y Barrell (1967) así como en otras especies eucarióticas (Hindley y Page, 1972 ; Kimura y Ohta, 1973) mientras que los otros rRNAs, lo están siendo actualmente (Fellner, 1971 y referencias allí contenidas) y prácticamente la secuencia del 16S RNA está terminada a falta de pequeños oligonucleótidos.

1.2.2. SUBUNIDAD 50S

Posee 34 proteínas y 2 moléculas de RNA, 5S y 23S. Tan solo 2 de estas proteínas (proteínas ácidas L7 y L12) han sido perfectamente caracterizadas, habiéndose determinado su secuencia (Terhorst y cols. 1973) encontrándose idénticas a excepción de que L7 está acetilada en su aminoácido N-terminal, serina. Brot y Weissbach (1972) han demostrado que L12 puede ser acetilada (para dar L7) en el sobrenadante (mediante la acción de acetil CoA) pero no en el ribosoma. Por otra parte, se ha encontrado que prácticamente todas las proteínas de esta subunidad se encuentran en la proporción de una copia por ribosoma. En el caso de L7 y L12 su presencia implicaría una proteína repetida dentro del ribosoma. Recientemente Thammana y cols. (1973) han demostrado mediante tres técnicas distintas (recuperación a partir de geles, dilución isotópica e inmunoprecipitación) que existen 3 copias por ribosoma de dichas

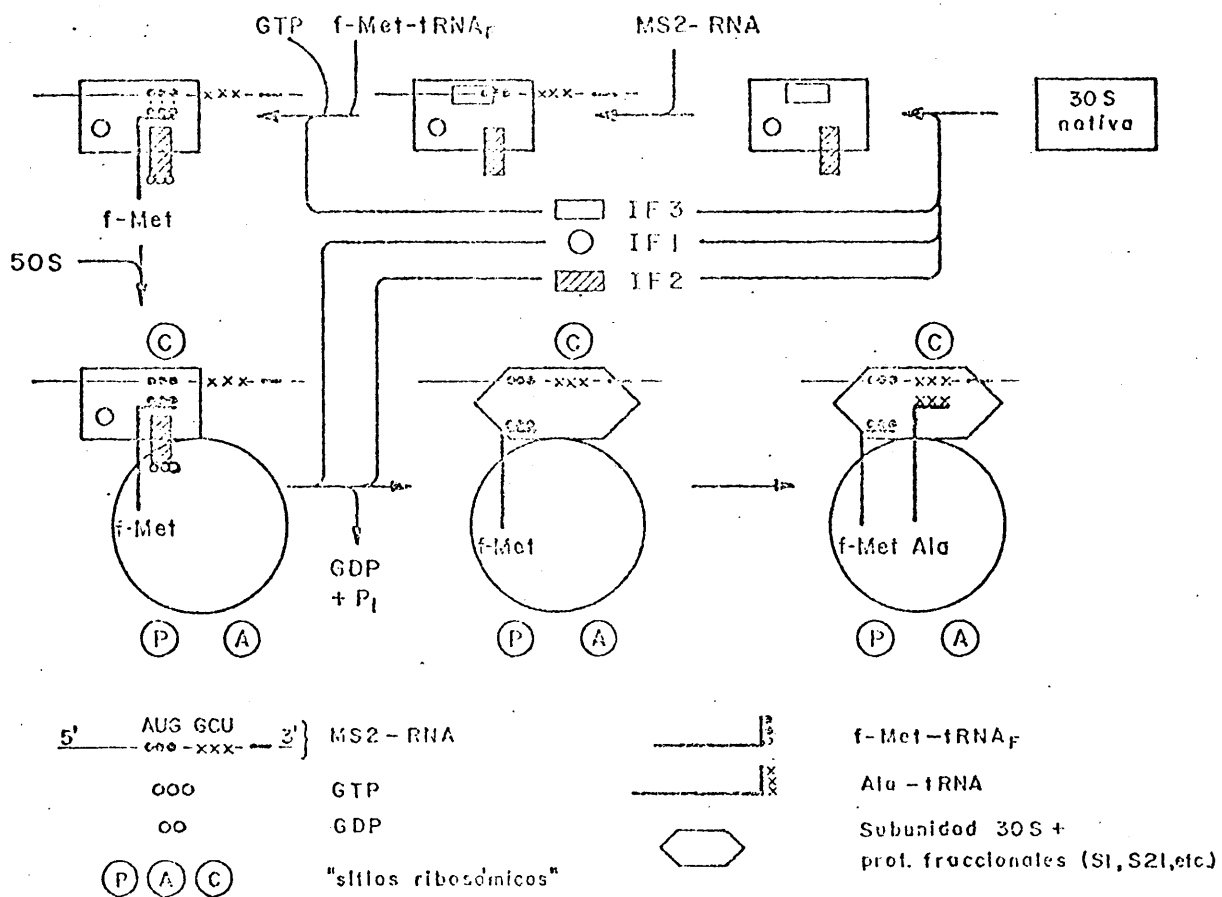


FIG.1.1. Esquema del proceso de iniciación (*E. coli*).

De acuerdo a:

| | |
|----------------------|--------|
| Benne, Ebes y Voorma | (1973) |
| Groner y Revel | (1973) |
| Kurland y cols. | (1972) |
| Vermeer y cols. | (1973) |

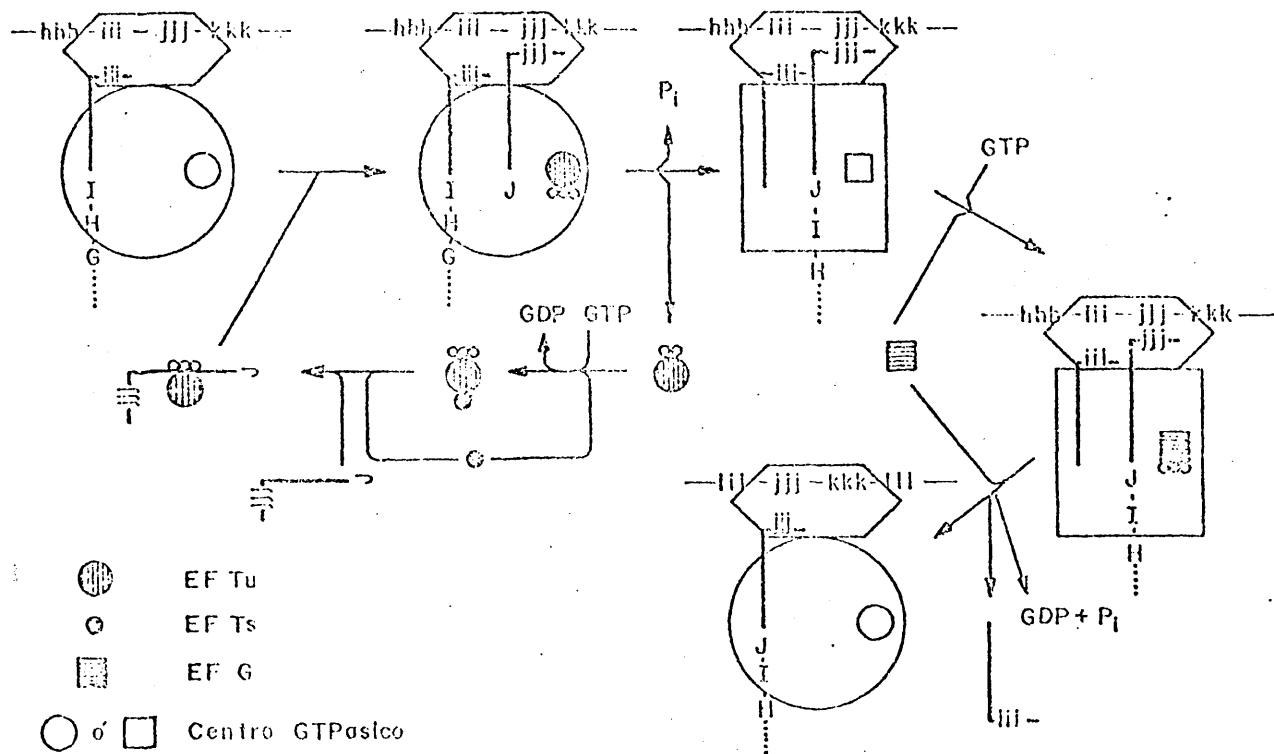


FIG.1.2. Esquema de las etapas de crecimiento de la cadena polipeptídica. De acuerdo a:

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biology (1969)
 Modolell, Cabrer y Vázquez (1973)
 Nombela y Ochoa (1973)

proteínas (L7 + L12) y su relación varía según que el medio de crecimiento sea mínimo (relación L7/L12 = 5) o rico (L7/L12 = 1,5). Su significado fisiológico es desconocido, si bien dadas sus características estructurales (Térhorst, 1973) tan similares a las proteínas contráctiles (Kiska, Möller y Stöffler, 1971) que tienden a operar en grupos multiméricos, se ha sugerido que ambas proteínas estuvieran involucradas en los fenómenos de transporte ribosómico a lo largo de las etapas de crecimiento de la cadena peptídica.

Menos controversial y totalmente establecido es la implicación de las proteínas L7/L12 en el centro GTPásico del ribosoma. Esto ha sido demostrado de dos formas distintas. (a) Mediante reacción antigénica de anticuerpos específicos de las 55 proteínas ribosómicas sobre la interacción de EF G con el ribosoma, encontrándose que solo aquellos correspondientes a L7 ó L12 (estas proteínas presentan idénticas propiedades inmunológicas) tenían efecto inhibidor (Highland y cols. 1973). (b) Ribosomas lavados con cloruro amónico 1M y precipitados con 50% de etanol pierden de 4 a 6 proteínas (Hamel Koka y Nakamoto, 1972; Sander, Marsh y Parmeggiani, 1972). Aislada la subunidad 50S y reconstituyendo partículas ribosómicas mediante adición de subunidades 30S intactas se observó que no eran capaces de catalizar la hidrólisis de GTP mediante la acción de IF 2 (Hamel, Koka y Nakamoto, 1972), EF T, EF G (Kischa Möller y Stöffler, 1971; Sopori y Lengyel, 1972)

y RF 16 (Brot y cols. 1973) así como la unión de EF G en presencia de GDP y ácido fusídico (Brot y cols. 1972). Sin embargo poseen normal actividad peptidil transferasa, fijación de aminoacil-tRNA dependiente de EF T y fijación del antibiótico tiostrepton (Hamel, Koka y Nakamoto, 1972; Sopori y Lengyel, 1972). Como se recordará la hidrólisis de GTP no era necesaria para ninguna de estas actividades. Adición de L7 L12 reconstituyeron todas estas actividades. Así en un principio, se pensó que L7 L12 eran el centro activo GTPasa del ribosoma, sin embargo experimentos hechos por Ballesta y Vázquez (1972b) y Hamel y Nakamoto (1972) han mostrado que metanol al 20% (v/v) es capaz de reconstituir estas actividades en ausencia de L7 L12. Estos resultados son muy importantes desde el punto de vista de consideraciones estructurales. Así L7 y L12 son indispensables para la actividad GTPásica, pero no por llevar ellas mismas el centro activo, sino por provocar una conformación ribosómica tal, que induzca a la proteína (u otro componente ribosómico) portadora de la actividad catalítica a adquirir su forma activa. A estos efectos son equivalentes las proteínas L7 L12 y 20% de metanol. Esto da una idea de la dificultad que representa atribuir funciones específicas a componentes estructurales individuales. Así el ribosoma debe ser considerado como una estructura donde cada componente aporta, en muy varia proporción, contribuciones a una u otra actividad ribosómica.

Confirmando estas hipótesis, Highland y cols. (1973)

han mostrado que otras proteínas L14, L19, L23 y L27, influyen en un menor o mayor grado la función GTPásica del ribosoma. Análogos resultados han obtenido Schrier, Maassen y Möller (1973) con L6 y L10. Mas aún dos proteínas de la subunidad 30S, S2, S9 (Marsh y Parmeggiani, 1973) son capaces de afectar este centro localizado en la subunidad 50S (Modolell, Vázquez y Monro, 1971; Ballesta y Vázquez, 1972c) lo que sugiere una estrecha relación con la zona de interacción entre ambas subunidades. Esto se pondrá de manifiesto en el apartado 1.2.5.

Otros estudios han sido hechos con vistas a identificar otras proteínas pertenecientes a esta subunidad. L2 y L27 aparecen ser responsables de la fijación de cloranfenicol mediante el empleo de un análogo (Bromanfenicol) que se fija covalentemente al ribosoma procariótico (Sonenberg, Wilchek y Zamir, 1973). Sin embargo en experimentos similares llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Pongs (Bald, Erdmann y Pongs, 1972), resultaron marcadas las proteínas L16 preferentemente y L24 no encontrándose fijación covalente cuando sustituyó el ribosoma 70S por la subunidad 50S (Pongs, Bald y Erdmann, 1973). Hasta el momento no existe explicación coherente a esta discrepancia, sin embargo Nierhaus y Nierhaus (1973) parecen confirmar la intervención de L16 mediante experimentos de reconstitución parcial de ribosomas. Mediante la técnica del marcaje por afinidad (Singer, 1967), Kuechler y cols. (1973) han demostrado que un derivado de aminoacil-tRNA (p-nitrofenil-carbamil ³Hfenilalanil-tRNA) se fija covalentemente a

las proteínas L14, L15, L16 y L27, siendo esta fijación dependiente de la adición de poli U e inhibida por puromicina. Nierhaus y Montejó (1973) en una tentativa aproximación de identificar la proteína responsable de la actividad peptidil transferasa han añadido a las "cores" (núcleos ribosómicos) obtenidos por tratamiento con cloruro de litio 0,8 M, aquellas proteínas desprendidas de la estructura ribosómica y parcialmente separadas por columna de DEAE-Sephadex ensayando dicha actividad mediante la reacción del fragmento. Se encontró una perfecta concordancia entre la formación de $\text{Ac}^3\text{H Leu-PM}$ y la elución correspondiente a la proteína L11. Estos resultados deberan ser confirmados mediante la adición de preparaciones de proteínas ribosómicas mas purificadas. No obstante resulta prometedor que puromicina interaccione con esta proteína L11 (Raacke 1973, comunicación personal) aunque el grupo de Pongs (1973, comunicación personal) haya encontrado fijación a la L24 usando un derivado iodado de este antibiótico. La proteína L4 es responsable de la resistencia ribosómica a eritromicina, junto con otros antibióticos pertenecientes al grupo de los macrólidos (Otaka y cols. 1971; Tanaka y cols. 1971).

Experimentos de reconstitución (ver apartado correspondiente a la subunidad 30S) a partir de los α , β , y γ "cores" (Staehelin, Maglott y Monro, 1969) no han reportado datos importantes en cuanto a localización de actividades en proteínas específicas, quizás por los razonamientos apuntados anteriormente respecto a las proteínas L7 y L12.

No obstante Ballesta, Montejó y Vázquez (1971a y b) encontraron que la actividad peptidil transferasa así como la actividad GTPasa se perdía en el paso de β a γ "cores" reconstituyéndose por la adición de las proteínas en él desprendidas.

Finalmente y en contra de lo hasta ahora reportado Bickle, Howard y Traut (1973) han encontrado que la proteína L2 esta ausente de las subunidades 50S "nativas" al igual que la L20, que a su vez tampoco ha sido encontrada en ribosomas pero si en monosomas o polisomas. La significación de estos resultados es aun desconocida.

1.2.3. SUBUNIDAD 30S

Los iniciales trabajos de Kurland y cols. presentados en 1969 (Cold Spring Harb. Symp. on Quant. Biology) hacían referencia a la presencia de múltiples proteínas ribosómicas fraccionales (es decir menos de 1 copia por ribosoma) mientras que el resto eran unitarias, no encontrándose ninguna que presentara mas de una copia por ribosoma. Así mismo la molécula de 16S RNA es unitaria. Estos resultados han sido ampliamente desarrollados y si bien aun nos hallamos en los albores del establecimiento de una estructura terciaria para el ribosoma, no es menos cierto que han ayudado de una forma definitiva al actual concepto dinámico que de él se tiene.

Uno de los métodos con mas profusión empleados y

que mas resultados positivos, ha suministrado a la hora de analizar la función de componentes ribosómicos individuales, han sido los sistemas de reconstitución. Desarrollados inicialmente por Traub y Nomura (1968) en la subunidad 30S (para una revisión de este tipo de experimentos, ver Nomura, 1970), 3 años mas tarde lo fueron en la otra subunidad (Nomura y Erdman, 1971). Estos experimentos llevados a cabo en B.stearotermophilus solo han podido ser realizados en la subunidad menor de E.coli siendo infructuosos los intentos con la subunidad 50S (reconst.total).

Al igual que se ha expuesto para la otra subunidad, los primeros resultados encontrados mostraron que ninguna proteína específica era requerida para una determinada función. Así experimentos de reconstitución con todos los componentes a excepción de uno determinado avocaban en partículas inactivas en practicamente todas las funciones. Las pequeñas diferencias encontradas fueron en todo momento cuantitativas pero no cualitativas. No obstante y mediante el ensayo de gradientes de sacarosa y determinación de los coeficientes de sedimentación de las partículas reconstituidas, Nomura y cols. (1969) determinaron que S4, S7, S8, S9, S16 y S17 eran indispensables para la reconstitución de la subunidad 30S. Independientemente y al mismo tiempo, Kurland y cols. (1969) mostraron que todos ellos (excepto S16 todavía no identificada) eran las únicas proteínas unitarias encontradas.

Tan solo S1 (proteína fraccional) pudo ser identifi-

cada funcionalmente mediante los ensayos de reconstitución. Van Duin y Kurland (1970) mostraron su total requerimiento para la asociación estable de la subunidad 30S con poli U como mRNA, existiendo una correlación paralela entre la cantidad de S1 presente y la fijación de fenilalanil-tRNA. Posteriores experimentos realizados por Van Duin y cols. (1972) han mostrado que S21, una proteína fraccional que al igual que S1 solo se encuentra en subunidades 30S obtenidas a partir de la fracción polisómica pero no en las subunidades nativas, inhibe la formación del complejo de iniciación por impedir la fijación de f-Met-tRNA_F dependiente de IF 2 a la subunidad 30S acompañada con AUG. Por el contrario S19 estimula esta fijación.

Otro método de investigación surgió de la consideración de que las proteínas fraccionales indicaban que no todas estaban presentes en los ribosomas obtenidos "in vitro" y por consiguiente sería posible estimular ciertas actividades por adición de componentes ribosómicos. Así Randall-Hazelbauer y Kurland (1972) han mostrado que S2, S3 y S14 actúan cooperativamente sobre la fijación de aminoacil-tRNA, es decir ejercen influencia directa (no ha sido observado ningún otro efecto para estas proteínas) sobre el sitio A de la subunidad 30S. Así mismo se ha encontrado un efecto estimulador de S9 y S13 sobre la fijación de aminoacil-tRNA pero dependiendo del factor de polimerización EF T. Dado que S13 y S19 son proteínas vecinas según ha demostrado Kurland y cols. (1973a) por el empleo de reactivos bifuncionales, este autor sugiere un único sitio

de fijación del tRNA (sitio C) sobre la subunidad 30S y dependiendo de que proteína actúe será estimulada la fijación de tRNA iniciador (S19) dependiente de IF 2 o la de cualquier aminoacil-tRNA (S13) dependiente de EF T.

Esta hipótesis tiene soportes mas sólidos en los experimentos que han demostrado que IF 2 dirige al f-Met-tRNA_F a un sitio sensitivo a puromicina (sitio P) mientras que estreptomicina, un inhibidor del sitio A en la subunidad 30S (Zagorski y cols. 1971) inhibe esta fijación, lo que unido al efecto estimulador de las proteínas fraccionales S2, S3 y S14 (van Duin y cols. 1972) relacionadas con el sitio A según se acaba de poner de manifiesto, han inclinado a Kurland y cols. (1972) a postular el modelo AC-PC (ver figura 1.1).

Aunque brevemente, es indispensable citar aquellos experimentos genéticos que han contribuido a asignar determinadas funciones a proteínas ribosómicas. Así la resistencia al antibiótico espectinomicina se debe a una alteración de la proteína S5 (Bollen y cols. 1969). Los fenómenos de resistencia o dependencia del antibiótico estreptomicina dependen de la estructura primaria de la proteína S12 (Birge y Kurland, 1969) mientras que supresión de la dependencia se localiza en la S4 según describieron posteriormente (1970) los mismos autores. Finalmente la resistencia al antibiótico Kasugamicina es debida a cambios en la metilación del 16S RNA (Helser, Davies y Dahlberg, 1971).

Por último otra tentativa de asignar funciones específicas a componentes individuales ha sido hecha empleando agentes capaces de inactivar ciertas funciones por interaccionar con determinadas proteínas (o RNA). Han sido extensivamente empleados los reactivos de grupos sulfidrilos, así como ciertos reactivos específicos para determinados aminoácidos. El problema surge a la hora de identificar que componentes son los responsables de la alteración observada (ejemplo: incapacidad de formar 70S, fijación de mRNA o aminoacil-tRNA, etc.) puesto que la especificidad de tales reactivos no es todo lo elevada que se hubiera deseado y mientras que son varias las proteínas afectadas, tan solo las modificaciones ocurridas en una o algunas de ellas son responsables de la inactivación observada. Tratamiento protegiendo las subunidades (es decir en presencia de 50S, mRNA, aminoacil-tRNA, etc.) dió cierta luz a estos experimentos. Así parece ser que la inactivación de los grupos sulfidrilos de la S18 (hay 7 proteínas mas que dan este tipo de reacción) es responsable de la pérdida de la función ribosómica (Moore, 1971). Tratamiento con tetranitrometano evidenció una pérdida de actividad en cuanto a la interacción mRNA-aminoacil-tRNA que fué restaurada por adición de las proteínas S11 y S21. Finalmente colicina E3 provoca inactivación de la subunidad por cortar un fragmento de 50 nucleótidos en el extremo 3' del 16S RNA (Senior y Holland, 1971; Bowman y cols. 1971). Un método mucha mas específico es la inactivación mediante anticuerpos (Stöffler y Wittmann, 1971b),

sin embargo su gran tamaño es causa de ciertas limitaciones en su empleo.

1.2.4. CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES

Una vez analizados, un tanto someramente, los conocimientos actuales acerca de los componentes individuales de los ribosomas de E. coli, se pretende en este apartado presentar aquellas experiencias tendentes a interrelacionarlos. En primer lugar se tratarán las interacciones entre proteínas y rRNA. Parece haberse demostrado (no sin largas controversias) que las regiones helicoidales del rRNA son muy importantes para la fijación de las proteínas (Bollen y cols., 1970). Schaup, Green y Kurland (1971) han mostrado que S4, S7, S8, S15, S17 y S20 se unen al 16S RNA, sin embargo S17 lo hace de forma inespecífica. S13 y S16 solo se fijan al rRNA si están presentes otras proteínas (ver mas adelante; figura 1.3).

Por lo que respecta a la subunidad 50S se han identificado L2, L6, L16, L17, L19, L20, L23 y L24 como proteínas con afinidad por el 23S RNA mientras que L2, L6, L18 y L25 la tienen por el 5S RNA (Stöffler y cols. 1971; Monier y Graz, 1972). El conocimiento íntimo de las interacciones proteína-RNA requiere estudios mas específicos. Así se han obtenido fragmentos de 16S RNA protegidos de digestión ribonucleásica por determinadas proteínas tales como S4 y S7 (Schaup y Kurland, 1972; Bogdanov, Shatsky y Spiridonova, 1972) habiéndose se-

cuenciado en el caso de la proteína S4. Esta técnica posee el criticismo de que es muy posible se trate de oligonucleótidos correspondientes a distintas partes del 16S RNA. Otro método actualmente en desarrollo consiste en romper suavemente y en fragmentos perfectamente delimitados el RNA y luego estudiar la fijación de las proteínas a cada uno de ellos. Mutantes de proteínas ribosómicas (S4) con débil afinidad por el rRNA (Green y Kurland, 1971) son de indudable valor, una vez conocida su secuencia (Donner y Kurland, 1972) a la hora de determinar a nivel molecular como ocurren tales interacciones.

Muy poco es conocido acerca de la estructura espacial que deben tener las proteínas y el RNA ribosómico. Si bien estudios primarios con enzimas proteolíticas o ribonucleasas (Chang y Flaks, 1971; Craven y Gupta, 1971) parecían indicar que ciertas proteínas eran interiores y otras exteriores; recientes experimentos hechos por Stöffler, Zeichhardt y Hassenbank (1973) han puesto de manifiesto que todas las proteínas ribosómicas interaccionan con sus correspondientes anticuerpos. Estos estudios, junto con consideraciones de hidratación hacen suponer que al menos en la subunidad 30S, las proteínas deben formar una capa monomolecular mantenida toda ella unida, de forma mas o menos directa, por el rRNA. Esta hipótesis debe ser confirmada. La estructura de la subunidad 50S debe ser evidentemente mas complicada y aun no se han trazado hipótesis concretas.

Otro método de aproximación al conocimiento de la posición en el espacio de los componentes ribosómicos, son los reactivos bifuncionales que unen pares de proteínas. Estos experimentos han sido desarrollados en el laboratorio del Dr. Kurland (Uppsala) y el actual estado de cosas (Julio 1973) aparece representado en la figura 1.3. Una vez aislados estos pares de proteínas (S5-S8, S7-S9, S13-S19 y S18-S21) se ha logrado reconstituir, en ciertos casos, subunidades activas por del resto de los componentes, lo que demuestra que estas uniones responden a situaciones "in vivo" y no son artefactos (esto solo ha sido reportado hasta el momento, con los pares formados por S5-S8 y S7-S9). Empleando reactivos bifuncionales de distinta longitud puede medirse la distancia existente entre ambas proteínas (Kurland y cols. 1973a). Con aquellos de una longitud de 5 \AA no existe reacción. Esto implica que la distancia interproteínica es superior a 5 \AA , es decir que no se hallan fuertemente empaquetadas. Se calcula que la distancia media oscila entre 8 y 10 \AA aunque todavía no existe evidencia definitiva. Recientemente ha sido reportado (Morgan y Brimacombe, 1973) un modelo espacial de las proteínas de la subunidad 30S que es la primera tentativa del establecimiento de una estructura espacial del ribosoma.

Estudios acerca del tamaño y forma de las partículas ribosómicas se encuentran perfectamente recopilados por Kurland (1972). Las características mas sobresalientes conocidas hasta el momento son, para la subunidad 30S:

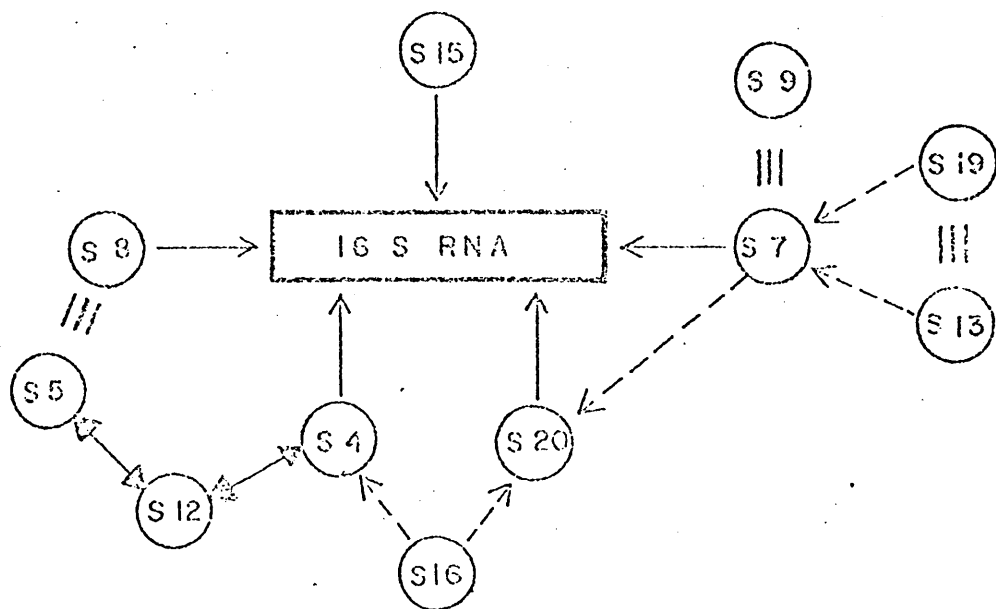


FIG.I.3. Interrelaciones entre las proteínas ribosómicas de la subunidad 30S de E.coli.

→ Fijación directa y específica al 16S RNA

--> Efectos de cooperatividad en su interacción con el 16S RNA.

||| Proteínas covalentemente unidas por reactivos bi-funcionales.

↔ Relación de fidelidad en la traducción.

S12 resistencia y dependencia a estreptomycin

S4 supresión de la dependencia a estreptomycin

S5 resistencia a espectinomycin

masa anhidra $0,9 (\pm 0,3) \times 10^6$ daltones. Su forma hidratada (0,3 gramos de agua por gramo de partícula ribonucleoproteínica) posee un volumen total de $1,5 \times 10^6 \text{ \AA}^3$, siendo su estructura un elipsoide de revolución achatada por los polos y relativamente asimétrico ($56 \times 224 \times 224 \text{ \AA}$). En cuanto a la subunidad 50S se han propuesto tres modelos (a) un elipsoide de triaxial ($130 \times 175 \times 259 \text{ \AA}$) (b) un cilindro elíptico ($121 \times 162 \times 194 \text{ \AA}$) y (c) un elipsoide de revolución ($225 \times 225 \times 113 \text{ \AA}$). Su volumen hidratado es 2 veces el de la subunidad menor y su masa anhidra $1,55 \times 10^6$ daltons.

1.2.5. FUNCIONALIDAD RIBOSOMICA

La sola enumeración de los datos presentados en los apartados precedentes da una idea de la enorme complejidad del ribosoma, así como de la gran cantidad de trabajo que queda por hacer y de los numerosos problemas planteados. El objetivo de este apartado consiste en dar una visión de las consecuencias de estos estudios en el concepto general de como trabaja un ribosoma. La subunidad 50S parece tener una estructura compacta y constante a lo largo de la síntesis polipeptídica según se deduce del unitarismo de sus proteínas, fenómeno generalmente aceptado a excepción de los resultados presentados por el grupo de Traut (Bickle y cols. 1973). Esto sin embargo no excluye una serie de cambios conformacionales tal y como se han puesto de manifiesto en la etapa de polime-

rización (Fig. 1.2). El panorama ante la subunidad 30S se presenta diametralmente opuesto. Varias son las posibles explicaciones para la presencia de proteínas ribosómicas fraccionales, pero hoy día tan solo parece tener vigencia la que considera a esta subunidad como heterogénea. Kurland (1972 y 1973b) ha sugerido que tal heterogeneidad refleja la situación que hubiéramos encontrado al detener la biosíntesis de proteínas en un determinado instante. Esto es, los diferentes estados que pueden acontecer en un ribosoma durante un ciclo completo de síntesis de proteínas. Es decir existe un único ribosoma cuya estructura cambia durante las etapas de iniciación, propagación y terminación de la cadena polipeptídica.

Si bien no existe un soporte experimental definitivo para esta visión dinámica del ribosoma (por otra parte cada vez mas aceptada) no es menos cierto que el mecanismo de acción de las proteínas S1 y S21 se ajusta perfectamente a este concepto y no a ningún otro de características estáticas. Así, S1 entraría a formar parte del ribosoma para estabilizar la interacción 70S o 30S-mRNA, una vez que IF 3 hubiera cumplido su cometido en la etapa de iniciación. De la misma forma S21, antagonista de la fijación de f-Met-tRNA_f dependiente de IF 2 solo formaría parte del ribosoma cumpliendo su función de estabilizar la interacción mRNA-tRNA (Craven y cols. 1969) una vez que el tRNA iniciador hubiera ocupado su sitio en el ribosoma. Acoplamiento entre la salida de IF 2 y la entrada de S21 no ha sido demostrado.

Este concepto dinámico del ribosoma posee otras implicaciones; hoy día no tiene gran sentido real, aunque en la práctica se hace, hablar de proteínas ribosómicas y de factores del sobrenadante, pues todos ellos pueden ser considerados componentes estructurales del ribosoma, unos permanentes y otros accidentales dependiendo de la etapa biosintética que le corresponda llevar a cabo en ese momento. Otra habría de ser la particular posición del ribosoma como macromolécula dentro del contexto general de la célula, descartándose las iniciales analogías que se quisieron encontraron con los viriones. Mas bien se podría buscar un paralelo con un complejo multienzimático. Un último punto a considerar es la relación existente entre las dos subunidades. Aquí la evidencia experimental es aun menor. Los modelos clásicos admiten que si bien existen funciones separadas para ambas subunidades (peptidil transferasa, interacción con el mRNA, etc.), otras son comunes, sitios A y P es decir fijación de tRNA. De esta forma resulta evidente que ciertas proteínas de ambas subunidades deben estar en íntimo contacto o al menos relacionadas funcionalmente. Gordon (1973) ha reportado que L19 y L27 por parte de la subunidad 50S y S9 y S11 por parte de 30S, son proteínas de pleno contacto mientras que L14 y L23 presentan características similares pero menos acusadas.

Estos resultados resultan muy interesantes si consideramos que estas proteínas intervenían de una forma par-

cial en el centro activo GTPasa, lo que confirma la relación existente entre esta función y la asociación entre ambas subunidades. Otras proteínas que intervienen en esta interacción sin estar relacionadas con la actividad GTPasica son, por parte de la subunidad mayor L8 y L9 y por parte de la menor S12 y S20. La observación hecha por Ebel (1973) acerca de que S11 se fija a un fragmento del 23S RNA (fragmento I₁) que posee alta afinidad (y es parcialmente protegido) por L24, está en plena concordancia con estas observaciones.

1.2.6. EL RIBOSOMA EUCARIOTICO

Los parámetros clásicos del ribosoma eucariótico tales como coeficiente de sedimentación, peso molecular, contenido en RNA o proteína etc... se encuentran muy detallados en revisiones tales como Petterman (1964), Spirin y Gavrilova (1969) y Maden (1971), (Tabla 1.1).

Por lo que respecta a ribosomas eucarióticos es decir, independientemente de aquellas líneas de investigación que estudian el mecanismo de síntesis de proteínas en estos sistemas, nos encontramos con que los estudios están orientados principalmente a 2 vertientes: biogénesis y estructura del ribosoma. La primera de ellas no la vamos a considerar por encontrarla poco relacionada con las experiencias presentadas en esta Tesis (ver Maden, 1971; Attardi y otros autores, 1972; Planta, van den Bos y Klootwijk, 1972; Mirault y Scherrer, 1972) y en cuanto a

TABLA I.1

RIBOSOMAS EUCARIOTICOS (MAMIFEROS)
PROPIEDADES *

| | Monomero | Subunidades | |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 60S | 40S |
| Constante de sedimentación (1) | 80S | 60S | 40-45S |
| Peso molecular(1) | $4,3 \times 10^6$ | $2,7 \times 10^6$ | |
| RNA (1) (cte. sedimentación) | | 28S 5S | 18S |
| Peso molecular, RNA(2) | | $1,8 \times 10^6$ | $0,7 \times 10^6$ |
| Contenido en RNA (2) | 50 % | | |

* Según B.E.H. Maden (1971)

(1) Spirin y Gavrilova (1969)

(2) Petermann y Pavlovec (1966)

la segunda se tratará de orientar hacia los principales resultados obtenidos ya que aun es prematuro hacer ninguna conclusión definitiva.

La mayor labilidad del ribosoma de organismos eucarióticos es el paso limitante. Obviaré toda la literatura destinada a la obtención de subunidades ribosómicas activas, dada la gran heterogeneidad de materiales empleados y principalmente la poca aplicabilidad general de tales métodos. Así se da la circunstancia de que ciertos procedimientos de completo éxito en ciertos laboratorios fracasan al tratar de ser repetidos en otros. Ante tan poco rigor científico en un paso tan preliminar, se comprenderá la carencia de resultados mas o menos definitivos en cuanto a componentes subribosómicos.

La mayoría de los estudios han sido llevados a cabo con ribosomas procedentes de hígado de rata o de reticulocitos de conejo. No obstante proteínas ribosómicas de S. cerevisiae han sido parcialmente resueltas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de una dimensión, encontrándose que la subunidad mayor posee alrededor de 50 proteínas de pesos moleculares comprendidos entre 10.000 y 46.000 mientras que la 40S posee alrededor de 30 y ninguna mayor de 30.000 daltones (Warner, 1971).

Estudios mas resueltos, empleando electroforesis bidimensional, han puesto de manifiesto que para ribosomas de hígado de rata existen 30 proteínas en la subunidad 40S y 39 en la 60S, mientras que los 80S contienen entre 68

y 72 proteínas, tres de las cuales no aparecían en las subunidades. Todas ellas (con una posible excepción) son únicas (Sherton y Wool, 1972). Welfle, Stahl y Bielka (1971) encontraron, utilizando el mismo procedimiento, 34 proteínas (manchas en el gel) específicas para la subunidad 60S, 27 para la 40S y 15 de idéntica movilidad en ambas, muy probablemente debidas a contaminación cruzada entre ambas subunidades. Este mismo grupo (Westermann, Bielka y Bottger, 1971) han aislado 31 proteínas ribosómicas por cromatografía en columna y han sido estudiados su composición global de aminoácidos y di-croismo circular entre 200 y 300 nm. Para una revisión ver Bielka y cols. (1972). Ningún resultado digno de mención fué obtenido.

Menos definitivos son los datos suministrados por King, Gould y Shearman (1971) para ribosomas de reticulocitos de conejo. 40 a 60 proteínas comprendidas en un rango de 8.000 a 57.000 daltones de peso molecular son asignadas a la subunidad mayor mientras que a la menor corresponden de 30 a 40 proteínas de pesos moleculares comprendidos entre 6.000 y 39.000. Además estos autores señalan que obtuvieron idénticos resultados trabajando con subunidades nativas o procedentes de la disociación de ribosomas. Utilizando esta misma técnica operativa (Delau-nay, Mathieu, Schapira (1972) han demostrado que (al menos por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida) no parecen existir diferencias entre las proteí-

nas ribosómicas del hígado de oveja, ternera, conejo o pollo adultos. Similares resultados se obtuvieron con las correspondientes al hígado, riñón y reticulocitos de conejo. No obstante esto no excluye que con técnicas mas resueltas, puedan ser apreciadas ciertas diferencias, ya sea dentro de la escala filogenética o dentro de los órganos de un determinado animal.

Han sido varios los autores que guiados por los resultados obtenidos en E.coli mediante diversos tratamientos que provocaban la perdida de ciertas proteínas ribosómicas dando lugar a los denominados "cores" o núcleos ribosómicos (Staehelin, Maglott y Monro, 1969). Tan solo el grupo de Reboud ha logrado obtener reconstituciones activas a partir de estos cores, por adición de las proteínas eliminadas (Reboud y cols, 1972). Sin embargo, ningún dato concreto ha emergido de estas experiencias. Ello se ha debido fundamentalmente a la total carencia de uniformidad en las partículas obtenidas pues su composición proteínica varía de un 27 a un 74% de la inicial. Además la perdida de actividad es total no habiéndose encontrado inactivaciones parciales. Una explicación a estos resultados podría ser, mas por analogía con lo anteriormente expuesto para E.coli que por base experimental, una heterogeneidad de la subunidad 40S (ver Discusión).

No obstante, recientes experimentos llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Wool (Wettenhal y cols. 1973), han demostrado la existencia de partículas 40S capaces

de formar dímeros a bajas concentraciones de potasio mientras que otra fracción no interconvertible con la anterior no las forma. Ambas eran activas si bien en mayor proporción la partícula dimérica. Otra característica a considerar es que esta no contenía tRNA deacilado mientras que la monomérica poseía por cada mol, 0,5 moles de tRNA. Finalmente ambas contenían las mismas proteínas ribosómicas.

Otros autores (Henshaw y Loebenstein, 1970; Mullock y cols. 1971) han reportado la existencia de dos formas de la subunidad menor del ribosoma eucariótico mientras que Vournakis y Rich (1971) observaron que en una serie de sistemas los ribosomas citoplasmáticos libres, poseen un diametro de mayor dimensión que aquellos implicados en la síntesis de proteínas y por ende unidos al mRNA formando la fracción polisómica. Otras diferencias como disociación en subunidades por diferentes concentraciones de cloruro potásico fueron observadas mientras que la masa total ribosómica permanecía constante. La conexión de los resultados presentados en esta Tesis, con estas características particulares de la subunidad menor ribosómica (tanto procariótica como eucariótica) será considerada ampliamente en el apartado correspondiente de la Discusión.

I.3. ANISOMICINA GOUGEROTINA Y TRICODERMINA

I.3.1. ANISOMICINA

El antibiótico anisomicina, aislado por Sobin y Tanner (1954) es un producto de la fermentación de varias especies de *Streptomyces*. Lynch y cols. (1954) reportaron su espectro antimicrobiano encontrándose un efecto negativo sobre bacterias y hongos patógenos mientras que sobre protozoos era muy efectivo. Se comprobó que era el mas activo de otras 18 drogas examinadas contra Trichomonas vaginalis, T. foetus y E. histolytica. Similares características junto con una descripción de otras propiedades químicas, de estabilidad y solubilidad fueron reportadas por Tanner, Sobin y Gardocki (1954).

Sus propiedades tóxicas y farmacológicas se determinaron merced a las experiencias de Gardocki y cols (1955). Si bien presentaba ciertos caracteres tóxicos (LD_{50} en ratones 140-148 mg/Kg) los monos toleraban (por periodos incluso superiores a 6 meses) dosis orales desde 1 a 50 mg/Kg. Cantidades entre 55-65 mg/Kg produciran ciertos trastornos, principalmente diarrea. Estos resultados indujeron a su aplicación médica para tratamiento de la disenteria amebica en Mejico (Cué y Diaz, 1961).

Los primeros estudios químicos aparecieron 4 años mas tarde en que Beereboom y cols. (1965) concluyeron que la estructura de anisomicina era 2-p-metoxi-fenilmetil-3-acetoxi-4-hidroxipirrolidina con los sustituyentes del ani-

llo pirrolidínico en posición "trans", cada uno respecto a sus adyacentes. Esta estructura fué corregida por Butler (1968) que demostró que si bien la posición entre los sustituyentes 3 y 4 era "trans" y la correspondiente a los existentes en 2 y 3 era "cis", tal y como aparece en la figura IV.15.

Por último, Oida y Ohki (1968) han sintetizado químicamente la forma racémica de anisomicina encontrando que su actividad era la mitad de la del compuesto natural. Ello es debido a que anisomicina proviene de L-tirosina (Wong, 1968) y tan solo su forma ópticamente activa (L-isómero) se corresponde con el antibiótico producido por los microorganismos.

Más recientemente, Felner y Schenker (1970) han logrado su síntesis química total partiendo del dietil L-(+)-tartrato. Todos estos estudios de carácter químico han llevado consigo la descripción de la síntesis u obtención de un sin fin de derivados, sin embargo en ningún caso fué descrita su actividad biológica. Los primeros datos acerca del mecanismo de acción de anisomicina los proporcionó Grollman (1967) quien mostró que inhibía síntesis de proteínas tanto "in vivo" como "in vitro" en reticulocitos de conejo y en levaduras pero no en bacterias. Ensayó ciertos derivados encontrando que su actividad era, o nula o muy inferior a la del compuesto original. Adicionalmente Grollman observó que anisomicina estabilizaba los perfiles de polisomas lo que implicaba, presumiblemente, un efecto

sobre alguna(s) etapa(s) del crecimiento de la cadena polipeptídica.

Esto fué comprobado dos años mas tarde cuando Vázquez y cols (1969) demostraron que se trataba de un inhibidor específico de formación de enlace peptídico catalizado por subunidades 60S procedentes de ribosomas eucarióticos de S.cerevisiae o amígdalas palatinas humanas (Neth y cols. 1970; Carrasco, 1973). Paralelamente y tras desarrollar un sistema de síntesis de polifenilalanina catalizado por este último tipo de ribosomas anisomicina se mostró como el mas potente de todos los inhibidores ensayados (Bermek y Matthaei, 1970).

Similares resultados obtuvieron Battaner y Vázquez (1971) cuando repitieron este ensayo catalizado por ribosomas procedentes de la levadura S.cerevisiae. Estos mismos autores mostraron que anisomicina interaccionaba con la subunidad 60S, pero no con la 40S, mediante pretratamiento con el antibiótico de ambas y posterior ensayo en síntesis de polifenilalanina. Así mismo concluyeron que producía una gran distorsión en el centro activo peptidil transferasa pues además de impedir su actuación catalítica, provocaba cierta inhibición en la fijación de sustratos tales como CACCA-³HLeu-Ac ó UACCA-³H-Leu pero no tenía efecto cuando se ensayaron los sustratos completos (es decir (Ac) aminoacil-tRNA).

Finalmente, Pestka y cols. (1972), mediante la reacción de liberación de péptidos nacientes por ³H-puromicina

a partir de la fracción polisómica reportó que anisomicina, junto con esparsomicina eran los únicos inhibidores competitivos respecto de puromicina en dicha reacción.

1.3.2. GOUGEROTINA

Este antibiótico fué aislado en 1962 por Kanzaki y cols. (1962) a partir de Streptomyces gougerotina, cepa aislada de una muestra de estiércol tomada en Kyoto (Japón). Los primeros estudios acerca de su composición química fueron llevados a cabo por Iwasaki (1962) quien estableció una estructura que posteriormente habría de ser corregida por Fox y cols. (1964) quienes a su vez la revisaron definitivamente en 1968 (Fox, Kuwada y Watanabe, 1968) dejándola establecida según aparece en figura 1.4.

Por lo que a su síntesis química se refiere, tan solo la parte nucleosica de la molécula ha podido ser obtenida (Watanabe, Kotick y Fox, 1970). Una detallada revisión de estructuras y síntesis parciales, no solo de gougerotina sino de un gran número de antibióticos del grupo aminohe-xosa-pirimidin-nucleósidos puede encontrarse en Fox, Watanabe y Bloch, (1966) y Suhadolnik (1970).

En cuanto a su modo de acción, la revisión de Pestka, (1971) ha recopilado prácticamente la totalidad de los trabajos publicados a este respecto. Por consiguiente me limitaré a dar referencia de los mas interesantes o mas directamente relacionados con los experimentos descritos en esta Tesis.

GOUGEROTINA

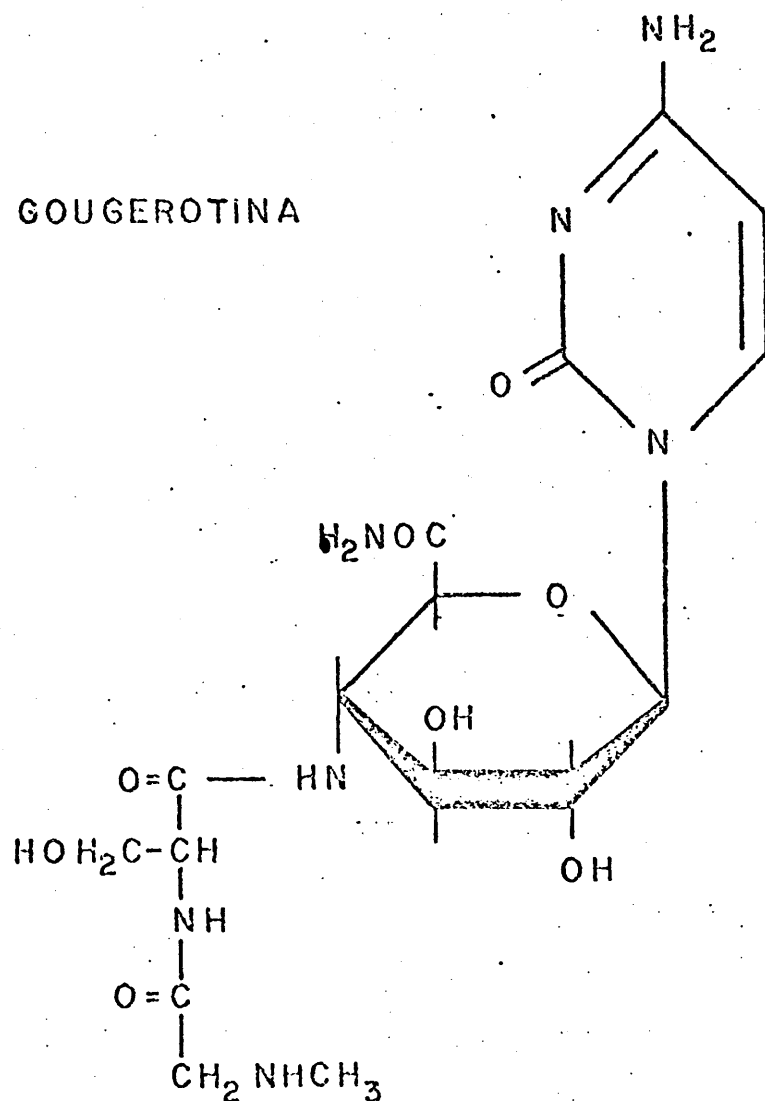


FIG.1.4. Estructura de gougerotina

De acuerdo a Fox, Kuwada y Watanabe (1968)

Su actividad inhibidora sobre la síntesis de proteínas fué mostrada en sistemas acelulares de E. coli (Clark y Gunther, 1963), hígado de ratón (Sinohara y Sky-Peck, 1965) y reticulocitos de conejo (Clark y Chang, 1965). Coutsogeorgopoulos (1967) observó su efecto sobre la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico. Casjens y Morris (1965) habían encontrado que gougerotina estabilizaba polisomas. Esto indujo a estudiar su efecto sobre los diversos sistemas de formación de enlace peptídico existentes; Golberg y Mitsugi (1967) reportaron su acción sobre la reacción de polilisil-tRNA con puromicina, igualmente Pestka (1970a) encontró actividad inhibidora sobre el centro activo peptidil transferasa usando como sustrato donador N-Ac-Fen-tRNA. En sistemas eucarióticos y empleando la misma reacción, Battaner y Vázquez (1971a) (levaduras) y Carrasco (1973) (amígdalas palatinas humanas) no encontraron efecto a concentraciones 10^{-4} M. La explicación a estos resultados pueden encontrarse en el apartado IV.2.

Gougerotina inhibe la formación de enlace peptídico ensayada según la reacción del fragmento catalizada por ribosomas de E. coli (Monro y Vázquez, 1967) de levadura (Battaner y Vázquez, 1971a) y humanos (Neth y cols. 1970) y (Carrasco, 1973). Goldberg y Mitsugi (1967) y Pestka (1972a) reportaron que gougerotina producía una inhibición de tipo mixto respecto a puromicina en su sistema de formación de peptidil-³H puromicina catalizada por

ribosomas de E. coli o de hígado de rata (Pestka y cols. 1972). Como una consecuencia de estos resultados no debe extrañar que Capecchi y Klein (1969) encontraran inhibición del proceso de terminación por gougerotina, habida cuenta de la intervención de peptidil transferasa en esta reacción (Vogel, Zamir y Elson, 1969; Caskey y cols. 1969).

Por lo que respecta a los sustratos de peptidil transferasa, a concentraciones elevadas (superiores a 10^{-4} M) estimula la fijación de Ac-Fen-tRNA a ribosomas (Jiménez, Monro y Vázquez, 1970) interfiriendo con esparsomicina en este mismo tipo de ensayos. De la misma forma gougerotina inhibe la "reacción de la esparsomicina" utilizando CACCA-Leu-Ac (Monro, Celma y Vázquez, 1969) mientras que por si sola es capaz de estimular ligeramente la fijación de este sustrato al ribosoma (Celma, Monro y Vázquez, 1970).

Al no afectar la fijación de Fen-tRNA pero si la de UACCA-Leu (Celma, Monro y Vázquez, 1971) o de CACCA-Fen (Pestka 1969; Harris y Pestka, 1973) y dadas las semejanzas estructurales de gougerotina con citidina (Fig. 1.4) se formularon hipótesis (Coutsogeorgopoulos, 1967) (Cerna, Lichtenthaler y Rychlik, 1971) acerca de un posible mecanismo de inhibición basado en competición del antibiótico con el extremo final CCA del sustrato aceptor. La invalidez de esta teoría se pone de manifiesto en Discusión.

Otros datos nos muestran a este antibiótico como to-

tal inhibidor de la fijación de ^{14}C blastidina S a ribosomas de E.coli (Kinoshita, Tanaka y Umezawa, 1970) mientras que no tiene efecto sobre la interacción de ^{14}C cloramfenicol, ^{14}C lincomicina, ^{14}C eritromicina (Fernández-Muñoz y cols. 1971) y ^{14}C tiamfenicol (Contreras, Barbacid y Vázquez, 1973) con este tipo de ribosomas.

Finalmente Cerna, Lichtenthaler y Rychlik (1971) han reportado que un derivado de gougerotina conteniendo un grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ en la posición 6' del azúcar, en lugar del residuo original de carboxamida ($-\text{CONH}_2$), posee una actividad aproximadamente 10 veces menor. Esta se pierde totalmente cuando el residuo sarcosil-D-seril amida esta unido al átomo de carbono 3' en lugar de al 4'.

1.3.3. ANTIBIOTICOS DEL GRUPO DE LA TRICODERMINA

Se trata de una serie de antibióticos de estructura sesquiterpénica de los que tricondermina ha sido tomado como representante del grupo debido a ser el mas estudiado desde un punto de vista biológico (ver mas adelante).

Todos ellos han sido considerados como productos tóxicos producidos por una serie de hongos, mas o menos relacionados, aislados principalmente de cereales. Poseen actividades antifúngicas y antineoplásticas. De ellos podemos destacar:

Tricondermina. - Fué aislada del hongo Trichoderma viridi

(Godfredsen y Vangedal, 1964). Su estructura química (Fig. 1.5) fué determinada por estos mismos autores en 1965.

Tricodermol. - (Fig. 1.5). Se obtiene por hidrólisis de tricodermina y posee su misma estructura a excepción del grupo acetato hidrolizado, esto es, 4β -hidroxi-12, 13-epoxi- Δ^9 -tricoteceno. Es idéntico a roridin C (Gutzwiller y cols. 1964). Fué aislado a partir de Myrothecium roridum por Harri y cols. (1962).

Fusarenón X. - Ha sido aislado de caldos de cultivo del hongo Fusarium nivale (Ueno y cols. 1969). Estos mismos autores han determinado su estructura (Fig. 1.5) resultando ser 3α , 7α , 15-trihidroxi- 4β -acetoxi-12, 13-epoxi- Δ^9 -tricotecen-8ona así como sus características tóxicas en animales.

Nivalenol. - Se trata del derivado desacetilado del Fusarenón X (3α , 4β , 7α , 15-tetrahidroxi-12, 13-epoxi- Δ^9 -tricotecen-8ona) y tiene su misma procedencia, (Tsunoda y cols., 1968).

Tricotecina. - Es producida por el hongo Trichothecium roseum (Freeman y Morrison, 1948). Estos autores descubrieron en 1949 algunas de sus propiedades químicas y biológicas. Sin embargo habían de pasar 10 años para el establecimiento de su estructura por Freeman, Gill y Waring (1959). Esta fué posteriormente corregida y definitivamente por Godfredsen y Vangedal (1965) como 4β isocrotoniloxi-

12, 13-epoxi- Δ^9 -tricotecen-8ona.

Tricotecolona. - Es el alcohol correspondiente a tricotecina (4 β hidroxí-12, 13-epoxi- Δ^9 -tricotecen-8ona). Este producto no es natural.

Crotocina. - Este antibiótico fué aislado en Hungría a partir de Cephalosporium crotocinigenum (Schol-Schwarz, 1965). Al igual que tricotecina se trata de un ester del ácido isocrotónico, cuya hidrólisis conduce a crotocol de estructura 4 β hidroxí-7 β , 8 β ; 12, 13-diepoxi-tricoteceno, según Gyimesi (1967).

Toxina T-2. - Obtenida a partir de Fusarium tricinctum, cepa de elevada toxicidad aislada de granos de trigo en Wisconsin (USA). Su estructura fué determinada por Bamberg, Riggs y Strong (1968) resultando ser 4 β acetoxi-8 α 3-metil butiriloxi-15 acetoxi-12, 13-epoxi- Δ^9 -tricoteceno.

Verrucarol. - Es el compuesto resultante de la hidrólisis de los miembros de la familia de las verrucarinas y las voridinas, a excepción de verrucarina E cuya estructura es totalmente distinta (no sesquiterpénica sino pirrólica, Pfaffli y Tamm, 1969) y roridin C que es idéntico a tricodermol. Su estructura, determinada por Gutzwiller y cols. (1964) resultó ser 4 β , 15-dihidroxí-12; 13-epoxi- Δ^9 -tricoteceno, es decir idéntica a tricodermol (roridin C) a excepción del grupo hidroxí del carbono 15. Su biosíntesis a partir del ácido mevalónico ha sido reportada por Achini, Muller y Tamm (1971).

Verrucarinas y Roridinas. - Verrucarina A ha sido el único miembro de esta familia estudiado en cuanto a su efecto inhibitor sobre síntesis de proteínas (ver mas adelante). Su estructura ha sido descrita por Gutzwiller y Tamm (1965a) (Fig. 1.5) resultando poseer un anillo heterocíclico adicional compuesto por 11 átomos de carbono y 2 átomos de oxígeno. Su estereoquímica fué determinada por Mc Phail y Sim (1966) mediante el análisis por rayos X de sus cristales. Se aisló de los hongos Myrothecium verrucaria y M. roridum (Harri y cols. 1962). Otras verrucarinas como verrucarina B o J poseen variaciones estructurales en el anillo que las diferencia de los otros antibióticos sesquiterpénicos. Así verrucarina B es idéntico a A excepto que en lugar del sustituyente hidroxílico del carbono 3' (Fig. 1.5) posee un grupo epóxido (Gutzwiller y Tamm, 1965b), mientras que verrucarina J no presenta ningún sustituyente en dicho carbono (Fetz, Bohner y Tamm, 1965). Todos ellos han sido aislados de los mismos microorganismos, al igual que los compuestos integrantes del grupo de las coridinas (excepto roridina C). Las mejores estudiadas desde un punto de vista estructural son roridina A, D, E y H merced a los trabajos del grupo del Dr. Tamm. Poseen el mismo anillo extra que las verrucarinas y existe una correspondencia con ellas (A con A) (D con B) y (E con J) a excepción de que llevan en posición 8' un radical 2-hidroxietil. La estructura de roridina H es ligeramente distinta (Traxler y Tamm, 1970).

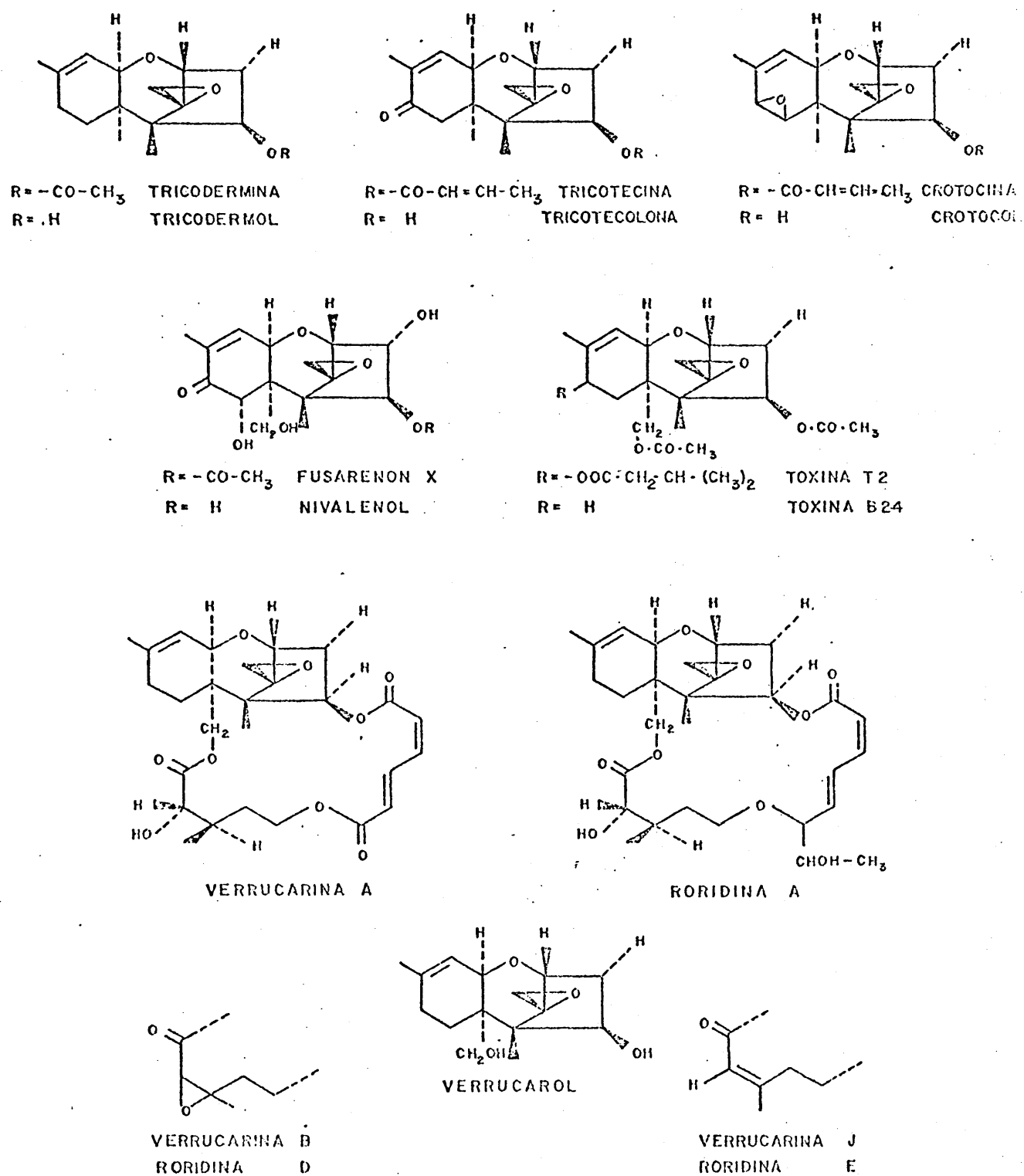


FIG. I.5. Antibióticos sesquiterpénicos. Estructuras

La nomenclatura de los antibióticos sesquiterpénicos descritos deriva del sesquiterpeno tricotecano cuya estructura es base para todos estos compuestos (Godfredsen, Grove y Tamm, 1967). Su conformación espacial, común para todos ellos, ha sido así mismo establecida por este equipo de investigadores (Snatzke y Tamm, 1967).

Los primeros estudios llevados a cabo con objeto de determinar el mecanismo de acción de estos compuestos fueron realizados por Ueno y cols. (1968) con nivalenol. De ellos concluyeron que el principio tóxico de este compuesto era la síntesis de proteínas. En un sistema de reticulocitos de conejo encontraron que nivalenol se comportaba como buen inhibidor de la incorporación de ^{14}C leucina en la célula completa, así como en un sistema acelular de síntesis de polifenilalanina. Comprobaron que no tenía efecto sobre la etapa de activación de aminoácidos ni sobre bacterias. A pesar de esta publicación, estos antibióticos habían pasado desapercibidos para la mayor parte de los laboratorios especializados en el estudio de los mecanismos de acción de inhibidores de biosíntesis de proteínas. Ello lo prueba el hecho de que no se les haga la más mínima mención en la completa revisión publicada por Pestka en 1971.

Ha sido precisamente 1973 el año en que este grupo de drogas ha tomado pleno auge en este tipo de estudios. (Cha-Mir y Mc Laughlin, 1973; Hansen y Vaughan, 1973), reportaron que triconodermina era un inhibidor específico de

terminación en eucariotes (S. cerevisiae cepa A364A). Esta conclusión tan sorprendente (hasta el momento no se conoce ningún inhibidor de estas características) se derivó de experimentos hechos "in vivo" que mostraba, en presencia del antibiótico, un incremento con el fenómeno de estabilización producido por cicloheximida (un inhibidor del proceso de polimerización), tomado como patrón unitario, poca base experimental para lanzar tan categorica afirmación. Contrariamente a estos resultados Ohtsubo, Kaden y Mittermayer (1972) han reportado que fusarón X produce degradación de polisomas en células L (fibroblastos de ratón).

El mecanismo de acción de algunos de los antibióticos anteriormente citados (tricodermina, tricomol, fusarenón X, verrucarina A y tricotecina) fué estudiado en sistemas "in vitro". Las conclusiones fueron muy distintas (Carrasco, Barbacid y Vázquez, 1973). Todos ellos se comportaban como inhibidores específicos de la formación de enlace peptídico en sistemas acelulares de S. cerevisiae y amígdalas palatinas humanas. Su actividad fué tricodermina > tricomol en la reacción de la puromicina (ver Métodos) y verrucarina A > fusarenón X > anisomicina (como referencia) > tricodermina > tricomol en la reacción del fragmento. Al igual que anisomicina (ver 1.3.1) estos antibióticos ejercen una acción disturbadora sobre el centro peptidil transferasa provocando inhibiciones parciales en la fijación de sustratos simplificandos es decir, fragmentos 3' terminales de tRNA. La relación entre anisomicina y

tricodermina así como el resto de los miembros ensayados de este grupo, es ampliamente estudiada en Resultados (Capítulos IV y V). De estos experimentos "in vitro" concluimos que tricodermina inhibe terminación pero no específicamente sino como una consecuencia de su efecto inhibitor sobre el centro activo peptidil transferasa cuya intervención en la etapa de terminación ha sido ya referida.

Recientemente Tate y Caskey (1973) han ensayado estos antibióticos (tricodermina y toxina T-2) en sus sistemas "in vitro" de terminación con ribosomas de reticulocitos de conejo, siendo sus conclusiones idénticas a las nuestras. Es decir, si bien tricodermina y toxina T-2 inhiben la liberación de formil-metionina dependiente del factor de terminación RF, también son activos inhibidores de la síntesis de formil-metionil-puromicina. Ambas drogas son igualmente activas en la formación de f-Met-etil ester (reacción también catalizada por peptidil transferasa) mientras que en el ensayo de liberación de formil-metionina en presencia de acetona (Caskey y cols. 1971) tan solo tuvo efecto tricodermina.

Concluyendo, los antibióticos del grupo de tricodermina vienen a unirse a anisomicina como inhibidores específicos de la formación de enlace peptídico en ribosomas eucarióticos.

CAPITULO II

- II.1 MATERIALES
- II.2 METODOS PREPARATIVOS
- II.3 METODOS ANALITICOS

II.1. MATERIALES

| | |
|--|-----------------------------|
| Acidos | Merck |
| acético (100%) | |
| clorhídrico (37%) | |
| fórmico (96%) | |
| Acido poliuridílico | Sigma |
| Adenosintrifosfato (sal dipotásica) | Sigma |
| Albúmina bovina | Sigma |
| Alúmina | Merck |
| Alúmina C γ | Calbiochem |
| Arena de mar purificada | Merck |
| Bacto-triptona | Difco |
| Bases | Merck |
| amoníaco (25%) | |
| Butil-PBD | Ciba |
| CAB-O-SIL (nombre comercial) | Packard |
| Carboximetil-celulosa (CM-23) | Whatman |
| ChromAR Sheet 500 (n.comercial) | Mallinckrodt |
| DEAE-Sephadex (A-50) | Pharmacia |
| Desoxiribonucleasa I (libre de RNasa) | Sigma |
| Extracto de levadura | Difco |
| ¹⁴ C Fenilalanina (\approx 500 mCi/mmol) | The Radiochemical Centre |
| Filtros fibra de vidrio GF/C | Whatman |
| Fosfo-celulosa (P 11) | Whatman |
| Glucosa | Merck |
| Guanosintrifosfato (sal dipotásica) | Sigma |
| ³ H Leucina (52 Ci/mmol) | The Radiochemical Centre |

| | |
|--|---------------------|
| 2-Mercaptoetanol | Fluka |
| Naftaleno | Merck |
| N-etil-maleimida | Serva |
| Papel de electroforesis (numeros 1, 3 MM y 17) | Whatman |
| Patrones de radioactividad (^3H agua y ^{14}C tolueno) | New England Nuclear |
| Ribonucleasa T_1 | Sankyo |
| Sacarosa (libre de RNasa) | AnalaR |
| Sacarosa (comercial) | Faes |
| Sales | Merck |
| Solventes orgánicos | Merck |
| TRIS base | Sigma |
| tRNA (sin fraccionar) de <u>E.coli</u> B | General Biochemical |
| Tubo de diálisis, Visking 8/32 | Serva |

Los reactivos de Merck fueron de grado analítico. Los de Calbiochem, General Biochemical, Sankyo, Serva y Sigma, del grado de mayor pureza. El resto según catálogo de las respectivas casas comerciales.

Antibióticos e inhibidores

| | |
|-------------------|--|
| Acido tenuazónico | Merck Sharp & Dohme Res.Lab. (Rahway, N.J., U.S.A.) |
| Actinobolina | Dr.J.Ehrlich, Parke Davis (Michigan, U.S.A.) |
| Amicetina | Dr.H.Whitfield, Upjohn (Kalamazoo, U.S.A) |

| | |
|------------------|--|
| Anisomicina | Dr. N. Belcher, Pfizer Inc. (Connecticut, U.S.A) |
| Blasticidina S | Dr. N. Tanaka, Ins. of Appl. Microbiology (Tokio, Japón) |
| Cicloheximida | Dr. H. Whitfield, Upjohn Co. (Kalamazoo, U.S.A) |
| Cloramfenicol | Dr. D. de la Bella, Zambon Lab. (Bresso-Milano, Italia) |
| Criptopleurina | Prof. M. R. Atkinson |
| Eritromicina | Abbot Laboratories (U.S.A) |
| Esparsomicina | Drug Research and Development (Div. of Cancer Treatment, N.I.H, USA) |
| Espiramicina III | Dr. A. Mc Fadzean, May & Baker Ltd. (Inglaterra) |
| Fusarenon X | Dr. Y. Ueno, Science University (Tokio, Japón) |
| Gougerotina | Calbiochem |
| Griseoviridina | Dr. A. Machamer, Parke Davis (Michigan, U.S.A) |
| Lincomicina | Dr. G. M. Davage, Upjohn Co. (Kalamazoo, U.S.A) |
| Oleandomicina | Dr. N. Belcher, Pfizer Inc. (Connecticut, U.S.A) |
| Puromicina | Nutritional Biochem. Corporation (USA) |
| Tiamfenicol | Dr. D. de la Bella, Zambon Lab. (Bresso-Milano, Italia) |
| Tricodermina | Dr. W. O. Godfredsen, Leo Pharmaceutical (Ballerup, Dinamarca) |
| Tricodermol | Dr. W. O. Godfredsen, Leo Pharmaceutical (Ballerup, Dinamarca) |
| Tricotecina | Dr. J. M. Barker, Imperial Chemical Ind. (Aldeley Park, Cheshire, Inglaterra) |

| | |
|----------------|---|
| Vernamicina A | Dr. H. B. Woodruff Merck Sharp & Dohme (Rahway, N.J. U.S.A) |
| Verrucarina A | Dr. A. von Wartburg, Sandoz, LTD y Dr. Ch. Tamm, Universidad de Basilea (Suiza) |
| Viridogriseina | Dr. J. Ehrlich, Parke Davis (Michigan, U.S.A) |

II.2 METODOS PREPARATIVOS

II.2.1 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE INTERCAMBIO IONICO

Se han empleado columnas cromatográficas Whatman de dimensiones 2,54 X 45 cms; un aparato standard para la formación de gradientes lineales y un colector de fracciones ISCO modelo 327. Todas las operaciones fueron llevadas a cabo a una temperatura de 0-4°C.

a) Cromatografía sobre carboxi-metil-celulosa.- Para preparar CM-celulosa tipo CM-23 (Whatman) cuyo contenido en polvo fino ha sido practicamente eliminado, se mezcla con 15 volúmenes (P/V) de NaOH 0,5 M, removiéndose cuidadosamente. Se deja sedimentar durante 30 minutos. El líquido sobrenadante se decanta y la celulosa así tratada se lava repetidas veces con agua siguiendo el mismo proceso hasta que ésta alcance un pH alrededor de 8. A continuación la celulosa es lavada con ácido clorhídrico 0,5 M que es posteriormente eliminado por sucesivos lavados con agua, siempre siguiendo el mismo método (sedimentación y decantación) hasta que ésta alcance un pH 4.

Una vez que la CM-celulosa ha sido tratada secuencialmente con álcali y ácido necesita ser equilibrada con los iones de la solución tampón que posteriormente ha de usarse en la cromatografía. En el caso que nos ocupa, carbonato amónico pH 8,6. Se añade al lecho celulósico un

volumen de solución tampón que contenga un equivalente del ión eluyente, esto es, ión amonio. Esta etapa es repetida cuatro veces siempre previa sedimentación y posterior decantación del líquido sobrenadante.

Tras el desplazamiento de los protones por los iones amonio solo resta estabilizar la celulosa con la solución tampón a la concentración deseada, esto es, la concentración de ión eluyente (NH_4^+) con la que se habrá de iniciar la cromatografía.

Se añaden 20 volúmenes de carbonato amónico 2 mM y se llevan a una probeta. Allí se dejan sedimentar por un tiempo determinado. Cuanto menor sea este tiempo más completa será la eliminación del grano fino. 20 minutos es suficiente para obtener una celulosa que una vez empaquetada en la columna produzca flujos rápidos y no se haga necesario el empleo de ningún tipo de presión para el desarrollo de la cromatografía.

El empaquetado se realiza vertiendo la celulosa así preparada, en la columna y pasando durante toda la noche a flujo moderado la solución tampón inicial (carbonato amónico 2 mM pH 8,6).

b) Cromatografía sobre fosfo-celulosa. - Se ha empleado fosfo-celulosa P 11 de Whatman de características similares en cuanto al tamaño de fibra a la CM-celulosa CM-23.

El procedimiento de lavado, equilibrado y empaquetado es idéntico al descrito en el apartado anterior. Se ha

utilizado el mismo ión eluyente (amonio) si bien la solución tampón es distinta (formiato amónico pH 2,8). La concentración de la solución tampón inicial fué de 0,15 M en ión amonio, y el volumen ocupado por la celulosa 75 ml.

II.2.2 ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAGE

Todos los ensayos electroforéticos tanto preparativos como analíticos (ver sección II.3) han sido realizados en un aparato de placas refrigeradas de 15 X 50 cms. marca Shandon en cuyos electrodos podían someterseles diferencias de potencial de hasta 10.000 voltios.

A lo largo de este trabajo los voltajes empleados estarán expresados en V/cm considerando que en todos los casos, la distancia entre las soluciones tampón correspondientes a ambos electrodos es de 57 cms.

El soporte empleado fué papel Whatman Nº 17 cortado en tiras de 14 X 57 cms. Para el contacto con las soluciones tampón situadas en los extremos de la tira se utilizó papel de filtro normal con objeto de no incrementar la conductividad, que en ningún caso fué superior a 70 mA. Previamente a su utilización el papel Whatman Nº 17 fué extensivamente lavado con el eluyente a emplear (ver II.2.4) siguiendo la técnica de cromatografía descendente. El sentido de fibra fué el mismo que luego habría de seguirse en la elución.

Las aplicaciones se realizaron en una banda lo más estrecha posible de 5 cms de longitud en la parte central

del papel y a una distancia del electrodo hacia el cual habría de migrar la sustancia a purificar, correspondiente a las $3/4$ partes de la longitud de la tira. A ambos lados de esta zona central preparativa se aplicó una cantidad suficiente para su detección posterior (alrededor de 1 micromol) de antibiótico no radioactivo así como del producto radioactivo a purificar.

Las condiciones experimentales, voltaje, tiempo, soluciones tampón etc. serán descritas en cada caso particular (ver Resultados).

II.2.3. CROMATOGRAFIA EN "ChromAR Sheet 500"

La diferencia entre resolución y nitidez de los productos separados utilizando papeles cromatográficos convencionales (Whatman 1,3 MM, 17,20 etc...) y ChromAR Sheet 500 fueron totalmente favorables a este último.

En cuanto a cualquiera de los lechos empleados en cromatografía en capa fina, las diferencias fueron menores pero siempre favorables al medio suministrado por Mallinckrodt lo que unido a su mayor facilidad de manejo y recuperación de los productos purificados hicieron que fuera ChromAR Sheet 500 el único medio cromatográfico empleado en la purificación de los tres antibióticos radioactivos descrita en esta Tesis.

ChromAR Sheet 500 está compuesto en un 70% por ácido silícico y en un 30% por fibra de vidrio lo cual le

hace aplicable cualesquiera que fuese el método de detección empleado. Además han sido eliminadas la mayoría de sustancias que absorben radiación ultravioleta a bajas longitudes de onda lo que es de gran utilidad a la hora de detectar los productos a purificar en las cromatografías preparativas. (Hay que tener en cuenta que en los niveles cuantitativos en que se ha trabajado tal detección directa mediante luz ultravioleta es imposible en papeles del tipo Whatman o similares).

La aplicación de la muestra es basicamente idéntica a la descrita en el apartado II.2.2 si bien varían las dimensiones del cromatograma. Este tiene una longitud de 20 cms y la aplicación se hace a 2 cms del extremo inferior. Su desarrollo es ascendente (16 cms) y se realiza a temperatura ambiente. Previamente el soporte fué lavado tal y como se ha descrito para el papel de electroforesis Whatman Nº 17. Las cubetas de cromatografía fueron Shandon de dimensiones 25 X 9 X 25 cms. Los solventes se describirán en Resultados.

II.2.4. ELUCION

Una vez localizada (ver apartado II.3.3) y recortada la zona del electroforegrama o cromatograma donde se encuentra la sustancia a purificar, ésta es eluida siguiendo un proceso similar al de la cromatografía descendente. Para ello se introduce un extremo del papel (o soporte cromatográfico) entre dos "portas" que se unen entre si, de

tal forma que el eluyente ascienda entre ellos por capilaridad. El otro extremo es introducido en el tubo colector que se situa a un nivel inferior al del eluyente. Esta técnica fué descrita por Heppel (1967) y permite recoger la sustancia purificada en un volumen mínimo dependiendo de su mayor o menor solubilidad en el eluyente. Puede conseguirse utilizando un eluyente apropiado que más del 50% del producto sea recogido en las 3 primeras gotas. No obstante la recogida de 2-4 ml redunda en un mejor rendimiento.

Mediante este tipo de elución se evitan en un gran porcentaje las impurezas procedentes del soporte empleado lo cual será de gran importancia a la hora de determinar pureza y actividad específica de los antibióticos radioactivos purificados (ver Resultados).

II.2.5. LIOFILIZACION

En todos los procesos de concentración de soluciones llevados a cabo en esta Tesis se aplicó la técnica de la liofilización.

Fué realizada a -40°C y 5 a 50 u de presión durante el tiempo requerido, en un liofilizador tipo Virtis modelo 10-145-MRBA. Las muestras eran previa e inmediatamente congeladas en una solución mezcla de acetona y anhídrido carbónico sólido.

II.2.6. SINTESIS DE DESACETILANISOMICINA

Anisomicina (2-p-metoxifenilmetil-3-acetoxi-4-hidroxi-

pirrolidina) posee un único enlace ester de reducida estabilidad en medio acuoso (ver Resultados), puesto que a 0°C y en un periodo de tiempo de 12 horas, más de un 30% es hidrolizado.

Esta hidrólisis, que conduce a la síntesis del desacetilanisomicina (2-p-metoxifenilmetil-3,4-dihidroxipirrolidina) es completa, si se calienta el antibiótico a reflujo durante 2 horas en una solución 1 N de NaOH (Beereboom y cols, 1965). Tras posterior recrystalización en agua se comprobó la total ausencia de anisomicina por espectroscopía infrarroja y se caracterizó por su punto de fusión.

II.2.7. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

- a) Levadura (*S. cerevisiae*)
- b) Amígdalas palatinas humanas
- c) Bacterias (*E. coli*)

a) Crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. - Se ha empleado la cepa PM-1 aislada de levadura de panadería por Ayuso y Heredia (1967). Se crecieron a 30°C en 2 fermentadores de 20 litros provistos de aireación y agitación.

El crecimiento fué detenido en fase logarítmica ($A_{660\text{ nm}} = 1$) por adición de anhídrido carbónico sólido. Una vez enfriadas a $0-4^{\circ}\text{C}$ se recogieron mediante centrifugación en flujo continuo siendo lavadas en una solución tampón (BSY) compuesta por TRIS-ClH (pH 7,4) 10 mM,

acetato magnésico 5 mM, acetato amónico 50 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM. Inmediatamente después fueron congeladas mediante una mezcla de nieve carbónica y acetona, almacenadas a -20°C por un periodo máximo de 3 meses a lo largo del cual conservan intacta su actividad.

La composición por litro del medio de cultivo fué: 3 gramos de extracto de levadura, 8 gramos de sulfato amónico, 20 gramos de glucosa, 0,02 gramos de cloruro magnésico y todo ello tamponado mediante fosfatos a pH 6.

b) Obtención de amígdalas palatinas humanas. - Las amígdalas palatinas humanas nos fueron amablemente suministradas por el Dr. León siendo tan solo seleccionadas aquellas procedentes de niños menores de 12 años. Inmediatamente después de la extracción eran colocadas a 0°C ; a continuación se lavaban repetidas veces con agua destilada hasta que esta quedaba completamente clara. Finalmente eran almacenadas a -20°C y conservadas por periodos de tiempo inferiores a 2 meses.

c) Crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*. - Se ha empleado la cepa D 10 (Gesteland, 1966) que carece de ribonucleasa lo que evita daños innecesarios al RNA ribosómico.

El proceso seguido es idéntico al descrito para el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* excepto la temperatura (37°C) y la composición del medio de cultivo: Bactotripton 10 gramos, cloruro sódico 8 gramos, extracto de

levadura 1 gramo y glucosa 2 gramos. Todo ello para 1 litro de volumen final (Lennox, 1955).

II.2.8. OBTENCION DE RIBOSOMAS CITOPLASMATICOS DE LEVADURA

Ribosomas 80S de levadura *S.cerevisiae* cepa PM-1 fueron obtenidos según métodos ya descritos (Ayuso y Heredia, 1968), (Battaner y Vazquez, 1971b). Las células almacenadas a -20°C fueron homogeneizadas en un mortero frente a arena de mar purificada (relación 1:2 (P/P)) hasta que la pasta de células y arena alcanzaba una gran consistencia, indicación de que el DNA celular había salido al medio. Entonces se añadía en la proporción 4 a 1 (volumen/peso de células), la solución tampón denominada BSY de composición: TRIS-ClH (pH 7,4) 10 mM, cloruro magnésico 5 mM, acetato amónico 50 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM. Se centrifugaba 2 veces: la primera a 10.000 g durante 5 minutos para eliminar la arena y los restos de células más groseros. La segunda, durante 30 minutos a 30.000 g para obtener la fracción microsómica conocida como S-30.

La etapa siguiente consistió en sedimentar los ribosomas por centrifugación a 150.000 g durante 2 1/2 horas. Estos ribosomas presentaban un alto grado de contaminación proteica, tanto inespecífica como de factores asociados a las distintas etapas de la síntesis de proteínas, así como de mRNA.

Para su purificación, eran resuspendidos en una solución tampón de alta concentración en amonio (BLY): TRIS-ClH (pH 7,4) 20 mM, cloruro magnésico 100 mM, acetato amónico 500 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM y centrifugados a través de un gradiente discontinuo de sacarosa al 20 y 40% en BLY, durante toda la noche a 150.000 g. El sedimento de ribosomas aparecía completamente transparente y era resuspendido en la mínima cantidad posible de una solución tampón (BRY) compuesta por: maleato amónico (pH 6,5) 50 mM, cloruro magnésico 5 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM (La concentración del ión amonio es alrededor de 100 mM) y almacenado en pequeñas alícuotas a -20°C . En todos los casos, tras la resuspensión de los ribosomas, estos fueron sometidos a un proceso de clarificado (20 minutos a 30.000 g) con objeto de eliminar agregados. La relación A_{260}/A_{280} que puede ser tomada como un índice de pureza respecto a contaminación proteica inespecífica fué 2,02 en los ribosomas lavados. Cuando esta relación era inferior a 2,02 se consideraba que los ribosomas no estaban suficientemente lavados.

II.2.9. OBTENCION DE RIBOSOMAS CITOPLASMATICOS DE AMIGDALAS PALATINAS HUMANAS

Al igual que en el apartado anterior han sido obtenidos siguiendo métodos ya descritos (Neth, Heller y Mattahei, 1968) a los que han sido introducidas ligeras modificaciones.

Las amígdalas (250 gramos) fueron troceadas y tras

añadir 3 volúmenes (p/v) de soluciones tampón de homogeneización (BHH: TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 5 mM, cloruro potásico 25 mM, 2-mercaptoetanol 7 mM y sacarosa 250 mM) fueron homogeneizadas mediante un triturador de aspas (mod. Ultaturrax).

La obtención de la fracción S-30 requiere dos centrifugaciones a baja velocidad, la primera para eliminar los trozos de tejido y partículas subcelulares más groseras (10 minutos a 10.000 g) y la segunda (30 minutos a 30.000 g) en la que sedimentan restos del retículo endoplasmático y la fracción mitocondrial.

A partir del S-30 se obtienen los ribosomas por centrifugación a 150.000 g durante 2 1/2 horas. Estos fueron resuspendidos en solución tampón de lavado (BLH) de composición: TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 10 mM, cloruro potásico 500 mM y sacarosa 250 mM. A continuación se agitaron durante 30 minutos en presencia de deoxicolato sódico a una concentración final del 1% con objeto de liberar los residuos de membrana sedimentados con la fracción ribosómica. Previo clarificado (20 minutos a 30.000 g) esta solución fue puesta sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (40 y 20%) en BLH y centrifugada toda la noche a 150.000 g.

Los ribosomas así obtenidos fueron resuspendidos de nuevo en BLH, clarificados y vueltos a sedimentar (3 horas a 150.000 g) para conseguir un más alto grado de purificación. Finalmente se resuspendieron en solución tampón de

resuspensión BRH cuya composición es idéntica a BHH excepto que no lleva sacarosa.

Tras el consiguiente clarificado los ribosomas fueron almacenados en pequeñas alícuotas en nitrógeno líquido. El valor de la relación A_{260}/A_{280} fué en esta ocasión 1,84.

II.2.10. OBTENCION DE RIBOSOMAS DE BACTERIAS (E.coli)

Se ha seguido sustancialmente el método descrito por Nishizuka y Lipmann (1966) siguiendo las posteriores modificaciones de Staehelin y cols. (1969).

Básicamente el procedimiento es similar al descrito en el apartado II.2.10 para la obtención de ribosomas de S.cerevisiae cepa PM-1 excepto en que la homogeneización se realizó con alúmina en lugar de arena de mar. Así mismo la composición de las soluciones tampón presenta ligeras variaciones:

Solución standard A: TRIS-ClH (pH 7,4), 10 mM, acetato magnésico 10 mM, acetato amónico 100 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM.

Solución de lavado B: TRIS-ClH (pH 7,4) 20 mM, acetato magnésico 20 mM, acetato amónico 1.000 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM.

Los ribosomas una vez obtenidos se pasaron a través de un gradiente discontinuo de sacarosa en solución B

tal y como se describió para levaduras. Además fueron sedimentados dos veces más, en solución tampón de lavado antes de resuspenderlos en una mínima cantidad de solución A. Tal y como se describió anteriormente, tras cada resuspensión de ribosomas, estos fueron clarificados por centrifugación a baja velocidad (30.000 g durante 20 minutos).

Actividad de los ribosomas. - En todas las preparaciones de ribosomas (tanto de levaduras, humanos o de *E.coli*) estos fueron ensayados en un sistema de síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico (apartado II.3.7) para comprobar su actividad, siendo esta enteramente dependiente de la adición del mensajero y de los factores del sobrenadante (II.2.12).

Factores de conversión. - Para la realización de estudios cuantitativos como los presentados en esta Tesis (ver Resultados) es condición imprescindible conocer la molaridad de las soluciones ribosómicas. A continuación se presenta una relación de los factores de conversión entre absorción a 260 nm y molaridad:

a) Ribosomas de *S.cerevisiae*: Una solución 10^{-6} M equivalente a 4 mg/ml (P.M. = 4×10^6 d) tiene una absorción de 56 unidades de densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm.

b) Ribosomas de amígdalas palatinas humanas: Una solución 10^{-6} M equivalente a 4 mg/ml (P.M. = 4×10^6 d) tiene una absorción de 52 unidades a una longitud de onda

de 260 nm.

c) Ribosomas de E.coli: Una solución 10^{-6} M equivalente a 2,65 mg/ml (P.M. = 2.65×10^6 d.) tiene una absorción de 45 unidades a una longitud de onda de 260 nm.

II.2.11. PREPARACION DE SUBUNIDADES RIBOSOMICAS DE LEVADURA

Dada la cantidad requerida para los experimentos de fijación de inhibidores a subunidades ribosómicas no ha sido posible usar las técnicas convencionales que utilizan rotores flotantes. Tan solo la centrifugación zonal habría de dar solución a este problema.

Se ha utilizado una centrifuga Beckman modelo L3 y un rotor asimismo Beckman/Spinco modelo Ti 15. El último requerimiento instrumental fué una bomba capaz de "construir" un determinado tipo de gradiente siguiendo la directriz gráfica de la ecuación matemática que lo define.

Empleamos un gradiente denominado equivolumétrico (Pollack y Price, 1971) en el que las partículas ocupan una posición (medida en volumen) directamente proporcional al valor de su coeficiente de sedimentación. Este gradiente había sido previamente diseñado por el Departamento de Instrumentación del Centro de Investigaciones Biológicas.

Las concentraciones límites de sacarosa fueron del 5 al 30% en una solución tampón cuyas condiciones iónicas eran: TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 4mM,

cloruro potásico 400 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM y que denominaremos tampón de disociación (BDY).

En primer lugar se introdujo en el rotor, el gradiente, en la dirección 5% al 30%. A continuación los ribosomas ($5.000 A_{260}$ equivalentes a unos 350 mg) que fueron diluidos con tampón de disociación hasta una concentración de $300 A_{260}/\text{ml}$ y posteriormente introducidos en el rotor formando un gradiente lineal con la solución 5% en sacarosa.

Finalmente fué introducida una capa de tampón de disociación hasta que el rotor quedó completamente lleno.

La centrifugación se llevó a cabo a una velocidad de 35.000 rpm y una temperatura de 15°C durante 6 horas. Transcurrido este tiempo y previa reducción de velocidad a 3.000 rpm (a la que se hicieron todas las operaciones de llenado) el gradiente fué desplazado por una solución acuosa de sacarosa al 50%, siendo recogidas 100 fracciones de 20 ml, cada una de las cuales contenía 1 ml de cloruro magnésico 1 M con objeto de elevar la concentración de ión magnesio, compensando la de potasio (400 mM) y evitando así que las subunidades se encuentren sometidas mas tiempo del necesario a las drásticas condiciones de disociación. Se determinó en un espectrofotómetro Gilford, la absorción de cada una de las fracciones a 290 nm con objeto de evitar diluciones y el resultado fué representado graficamente (Fig.II.1). Ambos picos, el correspondiente a la subunidad menor 40S y a la mayor 60S fueron extrapolados hasta absorción 0 desechándose aquellas fracciones inter-

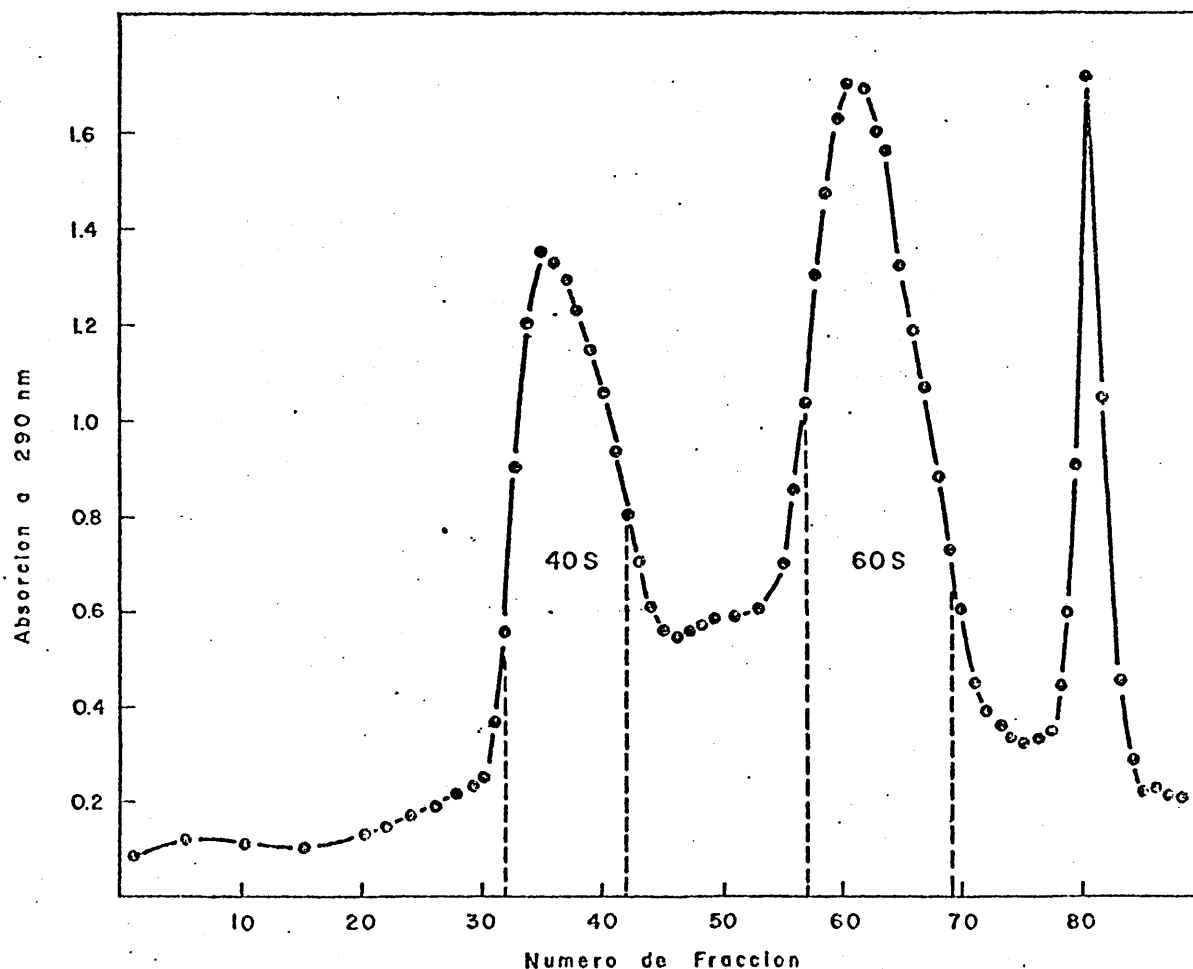


FIG.II.1. Obtención de subunidades ribosómicas de levadura
Perfil de densidad óptica.

Centrifugación zonal (35.000 rpm, 6 horas, 15°C) en rotor Ti 15 (Spinco/Beckman).

Gradiente equivolumétrico del 5 al 30% de sacarosa en TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, Cl_2Mg 4 mM, ClK 400 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM.

Se emplearon alrededor de 350 mg de ribosomas.

medias que contenían ambas subunidades, con objeto de eliminar contaminaciones.

Una vez reunidas las fracciones conteniendo cualesquiera de las dos subunidades fueron centrifugadas toda la noche a 150.000 g y posteriormente resuspendidas en BR Y. Tras la consiguiente clarificación se almacenaron en pequeñas alícuotas en nitrógeno líquido. Su actividad fué probada mediante un ensayo de síntesis de polifinilalanina mostrando idéntica actividad que los ribosomas 80S de los que procedían cuando ambas subunidades, la 40S y la 60S, fueron ensayadas conjuntamente; sin embargo no fué detectada prácticamente ninguna actividad cuando lo fueron cada una de ellas por separado (TABLA II.1).

La actividad peptidil transferasa, componente de la subunidad 60S fué así mismo estudiada según la reacción del fragmento (II.3.9) mostrándose inalterable con respecto al ribosoma intacto.

La pureza de los subunidades obtenidas aparece en la figura II.2. Estos ensayos han sido llevados a cabo según se describe en el apartado II.3.6., en las condiciones de reasociación (TRIS-ClHys ²-mercaptoetanol para evitar interferencias en la absorción A_{260} nm). La ausencia de máximo de absorción en la zona correspondiente a 80S indica que la contaminación cruzada de subunidades es mínima, (a) y (b). Sin embargo (c), donde han sido añadidas cantidades equimoleculares de ambas subunidades, muestra un pico de ribosomas 80S idéntico al que aparece en (d) corres-

TABLA II.1

ACTIVIDAD DE LAS SUBUNIDADES DE LEVADURA
SINTESIS DE POLIFENILALANINA

| Adiciones | pmoles ^{14}C Fen incorporados |
|-----------------------|--|
| Ninguna | 0,1 |
| Ribosomas | 2,9 |
| Subunidad 60S | 0,2 |
| Subunidad 40S | 0,1 |
| Subunidades 60S + 40S | 2,8 |

Condiciones iónicas BFY, 0,125 micromoles de GTP, 8 microgramos de poli U, 10,6 pmoles de ^{14}C Fen-tRNA y 20 pmoles de ribosomas o subunidades cuando se añadieron. Volumen final 0,1 ml. Incubación a 30°C durante 30 minutos.

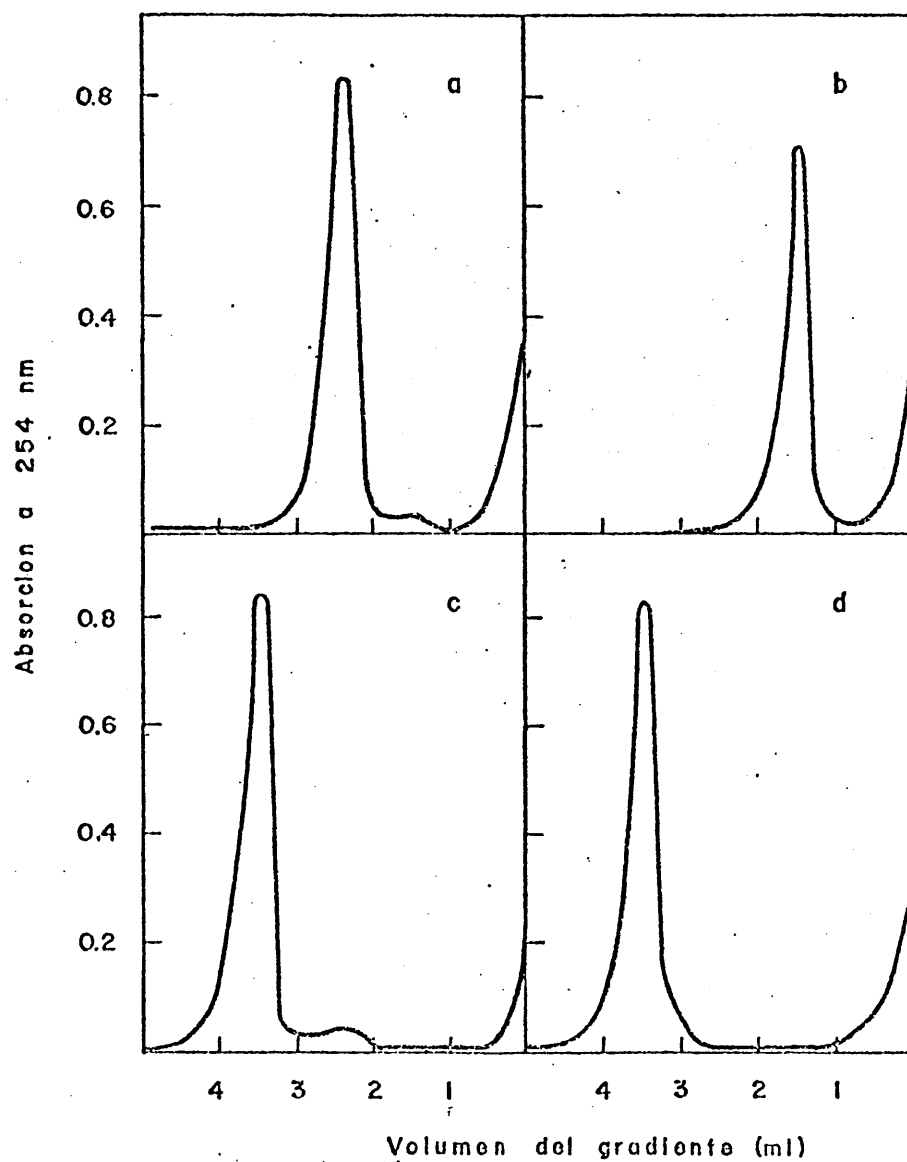


FIG.II.2. Gradientes analíticos de ribosomas y subunidades de S.cerevisiae.

- (a) Subunidades 60S
- (b) Subunidades 40S
- (c) Subunidades 40S + 60S
- (d) Ribosomas 80S control

Condiciones iónicas: TRIS ClH (pH 7,4) 50 mM, Cl_2Mg 12 mM y $AcNH_4$ 100 mM.

pondiente a ribosomas 80S. no tratados.

Por último la relación A_{260}/A_{280} fué de 2,09 para la subunidad mayor o 60S y de 2,13 para la menor o 40S. El peso molecular de ambas subunidades es (Pettermann , 1964) P.M. (60S) = $2,7 \times 10^6$ daltons y P.M. (40S) = $1,3 \times 10^6$ daltons, siendo el factor de conversión de unidades de densidad óptica a 260 nm a molaridad, el mismo empleado con ribosomas 80S de levadura.

II.2.12. PREPARACION DE EXTRACTOS CRUDOS DE FACTORES DE POLIMERIZACION

Los factores de polimerización, EF T y EF G en E.coli, o EF 1 y EF 2 en sistemas eucarióticos, son necesarios para la polimerización de cadenas peptídicas en sistemas acelulares tales como la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico. En estos sistemas solo dichos factores son necesarios, puesto que la iniciación se hace de forma no enzimática a alta concentración de ión magnesio (12 mM) y el proceso de terminación no es requerido.

Análogo razonamiento puede ser aplicado al otro ensayo descrito en esta Tesis, reacción de la puromicina a partir del complejo postranslocado (II.3.8). Como es sabido la reacción del fragmento (II.3.9) no requiere ningún tipo de factores.

No obstante se ha comprobado que no es necesario

purificar dichos factores hasta un grado mas o menos alto de homogeneidad sino que preparaciones crudas, esto es con etapas muy simples de purificación, ejercen el cometido que les ha sido encomendado con plena eficiencia.

En este apartado se describen los S-100 (tal es la denominación comunmente aplicada a estas preparaciones crudas de factores) de S.cerevisiae y E.coli. El S-100 de amígdalas palatinas humanas fué tan solo empleado en ensayos de actividad de las preparaciones de ribosomas y me fué donado por L.Carrasco que lo preparó por métodos ya descritos (Bermek y Matthaei, 1970).

a) S-100 de levadura. - Se ha seguido el método desarrollado por Ayuso y Heredia (1967) cuyo fundamento estriba en que los dos factores de elongación se adsorben a alúmina $C\gamma$ y son eluidos de ella mediante soluciones de tampón fosfato 0,5 M pero no 0,1 M manteniendo siempre el pH 6,5. Este permite la eliminación de gran parte de proteínas entre las que se encuentran ribonucleasas y proteasas.

El procedimiento es muy elemental. Se mezclan el sobrenadante resultante del primer sedimento ribosómico con alúmina $C\gamma$ (una suspensión 10 mg/ml) en la proporción 10:1 (v/v). Se agita suavemente durante 15 minutos y se recoge la alúmina por centrifugaciones a baja velocidad (30.000 g 10 minutos) descartándose el sobrenadante. Esta operación se repite en presencia de una solución tampón de fosfato monopotásico (pH 6,5) 0,1 M. Los factores unidos a la alúmina son desprendidos mediante adición de una pequeña

cantidad (1-2 ml) del mismo tampón pero 0,5 M. La alúmina se elimina por centrifugación y el sobrenadante así obtenido se conserva almacenado en pequeñas alícuotas a -20°C . Su actividad es ensayada complementariamente a la de los ribosomas en un sistema acelular de síntesis de polifenilalanina. Todo el proceso se realiza a la temperatura de 0°C .

b) S-100 de *E.coli*. - En este caso no existe realmente ningún proceso de purificación. La única operación a realizar consiste en dializar el S-100 procedente de la sedimentación de ribosomas a partir del S-30, frente a un gran exceso de tampón A, con objeto de eliminar todos los aminoácidos. La razón de este tratamiento es muy simple: el S-100 contiene las aminoacil-tRNA sintetasas necesarias para la carga de fenilalanina en su tRNA correspondiente (II.2.13). La presencia de este aminoácido en el S-100 disminuiría de forma no controlable la actividad específica del correspondiente aminoácido radioactivo que se emplea en la aminoacilación del tRNA.

II.2.13. PREPARACION DE ^{14}C FENILALANIL — tRNA Y N-Ac- ^{14}C FENILALANIL—tRNA

El método seguido ha sido el descrito por Conway (1964). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 10 ml: TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 10 mM, cloruro potásico 100 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, ATP 3 mM, tRNA sin fraccionar de *E.coli* B 20mgs,

^{14}C fenilalanina (actividad específica alrededor de 500 mCi/mmol) $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ y finalmente 1 ml de S-100 de E.coli (II.2.12).

La incubación, a 37°C , durante 30 minutos fué detenida por adición de 1 ml de acetato sódico al 20% (pH 5,4). El tRNA fué extraído con fenol destilado y saturado de agua (20 ml). La mezcla fenólico-acuosa hubo de agitarse fuertemente durante 10 minutos y tras una corta centrifugación con objeto de separar ambas capas se tomó la fase acuosa mientras que la fenólica fue extraída con 5 ml de la solución de acetato sódico que tras agitar y centrifugar tal y como se indica más arriba se añadió a la capa acuosa de la primera extracción.

El tRNA así extraído fue precipitado con 2 volúmenes de etanol frío (-20°C). Una vez centrifugado y eliminado el sobrenadante se resuspendió en un pequeño volumen de acetato potásico 0,5 M (pH 6.0) volviéndose a precipitar por adición de etanol frío.

Finalmente el sedimento de tRNA fue secado a vacío con objeto de eliminar cualquier traza de solventes orgánicos y resuspendido en 1 ml de agua destilada. Su almacenamiento, tal y como se ha venido describiendo a lo largo de esta sección, en pequeñas alícuotas en nitrógeno líquido.

La eficiencia de la carga varió de un 40-60% según las preparaciones de S-100 empleadas, mientras que el porcentaje de recuperación del tRNA fué siempre superior

a un 85%.

La acetilación del fenilalanil-tRNA se realizó de acuerdo a Haenni y Chapeville (1966). Una solución de aminoacil-tRNA (^{14}C Fen-tRNA) tamponada a pH 5 mediante una solución de acetato sódico 1 M (concentración final 0,2 M) se incubó a 0°C durante 2 horas. La acetilación tuvo lugar mediante adición de 0,15 ml de anhídrido acético recientemente destilado a los tiempos de 0, 40 y 80 minutos.

La recuperación y almacenamiento del N-Ac ^{14}C Fen-tRNA fué idéntica a la descrita para el compuesto sin acetilar. La eficiencia de la acetilación fué siempre superior al 95%.

La actividad de ambos compuestos fué ensayada mediante sistemas standards descritos en los apartados II.3.7 (síntesis de polifenilalanina) y II.3.8 (reacción de la puromicina), respectivamente.

II.2.14. PREPARACION DE FRAGMENTOS 3' TERMINALES DE AMINOACIL-tRNA

Existen varias especies de tRNA con actividad aceptora del aminoácido leucina. La secuencia del extremo 3' terminal ha resultado ser $\text{GCACCA}_{\text{OH}}$ y $\text{GUACCA}_{\text{OH}}$ en las 2 especies isoceptoras predominantes.

Sometiendo Leu-tRNA o bien Ac-Leu-tRNA (preparado según se ha descrito en el apartado anterior para Ac-Fen-tRNA) a digestión por ribonucleasa T_1 que es

una endonucleasa específica de los enlaces pGpX obtendremos entre otros fragmentos de la molécula de tRNA, aquellos 3' terminales portadores del aminoácido de secuencia C/UACCA-Leu-Ac que son sustratos del centro activo peptidil transferasa del ribosoma (ver reacción del fragmento II.3.9).

En este trabajo ha sido tan solo necesario preparar el "fragmento acetilado"; sin embargo el método descrito es válido igualmente para el no acetilado.

Dado que la utilidad principal de C/UACCA-Leu-Ac es actuar como sustrato donador en la reacción del fragmento no se requiere una total pureza respecto a otros fragmentos del tRNA producidos en la digestión y que no corresponden al extremo 3' (por consiguiente no aminoacilados). Por ello se ha deshechado el método clásico de preparación (Monro, Cerna y Marcker, 1968) empleándose la cromatografía en columna de intercambio iónico tomando como referencia el método descrito por Pestka (1971b).

La digestión por ribonucleasa T_1 fué hecha según condiciones standard. En un volumen final de 0,75 ml se preparó una mezcla de incubación que contenía acetato sódico (pH 5,4) al 0.2%, EDTA 2 mM, 23 mg de la preparación de $Ac^3HLeu-tRNA$ que contenía 3.000 pmoles de este producto y 0.45 mg de RNasa T_1 .

La incubación a $37^{\circ}C$ se prolongó durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió formiato amónico (pH 5,0) hasta ponerlo a una concentración 10 mM que

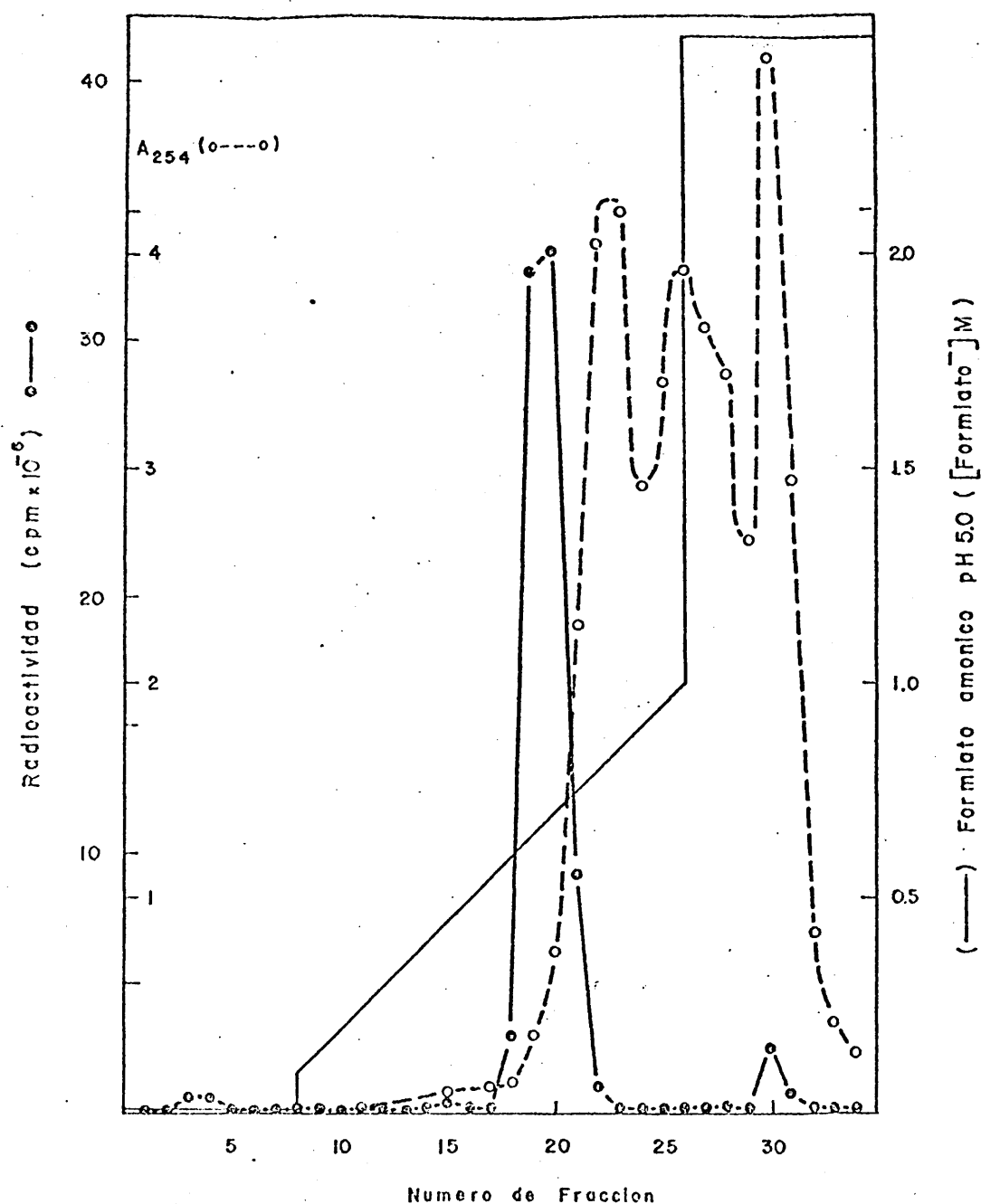


FIG.II.3. Obtención del fragmento acetilado

Columna de DEAE-Sephadex A-50.
 Aplicación de 23 mg (tRNA total) de la preparación de Ac- 3H -Leu-tRNA digeridos por 0,45 mg de RNasa T₁.
 Se tomaron las fracciones 19 y 20.

habría de ser la solución tampón inicial de una columna de DEAE-Sephadex A-50 previamente estabilizada.

Se pasaron 100 ml de dicho tampón con objeto de eliminar la radioactividad no unida ($^3\text{H Leu}$) y a continuación un gradiente lineal (150 ml) así mismo de formiato amónico pH 5 pero de concentraciones 0,1 M hasta 1M. El fragmento C/UACCA $^3\text{H Leu-Ac}$, es eluido a una concentración del tampón alrededor de 0,5 M. En el caso de que la digestión no hubiera sido completa habrían de aparecer otros fragmentos de mayor tamaño que eluirían secuencialmente hasta la concentración tope de 1 M.

Con objeto de lavar completamente la columna se pasaron 100 ml de solución 2,5 M. Cualquier porción de aminoacil-tRNA resistente a la digestión eluye en esta etapa. Las fracciones en las que apareció el pico de radioactividad - 19 y 20 - (20 ml) fueron liofilizadas, resuspendidas en 2,5 ml de agua destilada y posteriormente almacenadas en pequeñas alícuotas en nitrógeno líquido.

En la figura II.3 puede observarse el resultado obtenido en una de las preparaciones. De ella puede deducirse que la contaminación por otros fragmentos de tRNA distintos del 3' terminal en las fracciones en las que eluye C/UACCA $^3\text{H Leu-Ac}$ es prácticamente despreciable frente a la densidad óptica total eluida a través de la columna.

La actividad del fragmento acetilado así obtenido fué ensayado según la reacción del fragmento (II.3.9).

II.2.15. PREPARACION DEL COMPLEJO TERNA - RIO N-Ac ^{14}C FEN-tRNA-POLI U-RIBOSO - MAS EN SU FORMA POSTRANSLOCADA.

Ha sido preparado con ribosomas de S.cerevisiae y de E.coli. El proceso consta de dos etapas:

a) Fijación no enzimática de N-Ac ^{14}C Fen-tRNA a un sitio no reactivo con puromicina (sitio A)..- La mezcla de reacción contenía en su volumen final de 7,5 ml una solución TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 20mM, acetato amónico 100 mM, 0,9 mg de ácido poliuridílico como mRNA, 10,3 mg de ribosomas y 2,11 nanomoles de N-Ac ^{14}C Fen-tRNA. Se incubó a 30°C durante 20 minutos y a continuación se realizó la segunda etapa.

b) Translocación del N-Ac- ^{14}C Fen-tRNA a un sitio reactivo con puromicina (sitio P)..- Para ello se añadieron a la mezcla de incubación descrita en el apartado anterior 10 micromoles de GTP y 0,5 mg de proteína de una preparación de S-100 que contenía el factor de translocación EF 2, dando un volumen final de 9 ml.

Tras incubar 12 minutos a la misma temperatura se puso esta solución en un tubo de centrifuga, sobre 2 ml de otra de idéntica composición salina pero al 20% en sacarosa. Se centrifugó a 175.000 g durante 3 horas. El sedimento fue resuspendido en 0,4 ml de BFY (maleato amónico (pH 6,5) 50 mM, cloruro magnésico 12 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM) en el caso de ribosomas de levadura o en la misma can-

tividad de BFB (TRIS-ClH (pH 7,4) 33 mM, cloruro magnésico 13 mM y cloruro potásico 270 mM) en el caso de ribosomas bacterianos. Ambas soluciones tampón BFY y BFB son las correspondientes a los estudios de fijación de antibióticos a ribosomas de levadura y bacterias respectivamente.

Este complejo era usado inmediatamente después o como máximo al día siguiente a su preparación, siendo en tal caso almacenado a -20°C . A los 7 días conservaba el 90% de su actividad en reacción con puromicina (II.3.8.), si bien su cinética era más lenta.

NOTA FINAL: Todos los procedimientos descritos en esta Sección II-2, han sido realizados a la temperatura de $0-4^{\circ}\text{C}$ excepto en aquellos casos en que haya sido especialmente indicada otra temperatura.

II.3. METODOS ANALITICOS

II.3.1. ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAGE

El papel preferentemente utilizado fué Whatman 3 MM, si bien en aquellos casos en los que la intensidad de la corriente a través del tampón era muy elevada se usó Whatman 1.

Todo el montaje operativo fué idéntico al descrito en el correspondiente apartado preparativo. Las aplicaciones, 4 por ensayo, se colocaron a lo largo de una línea transversal de la tira, ocupando cada una de ellas 1 cm de anchura y 2 cms de separación respecto de las contiguas.

Una vez concluida la electroforesis y secado el electroferograma se cortaron en un sentido longitudinal las 4 tiras correspondientes a las aplicaciones, siendo cortadas en secciones transversales de 1 cm y estimándose su contenido en radioactividad tal y como se describe en el apartado II.3.5.

II.3.2. CROMATOGRAFIA EN "ChromAR SHEET 500"

Ya han sido descritas en la sección preparativa las ventajas de este medio cromatográfico. Si bien a nivel analítico las diferencias con los otros medios empleados tales como papel o capa fina fueron mucho menores (prácticamente nulas respecto a esta última), su facilidad de manejo

y la correlación que siempre ha de existir entre niveles analíticos y preparativos nos inclinó a su uso. No obstante, los distintos medios ensayados no presentaron sustanciales diferencias respecto a R_F o posiciones relativas de los picos de radioactividad.

La mecánica operativa fué tal y como se describió en la sección preparativa con las mismas modificaciones introducidas en la electroforesis analítica. La única diferencia, es que dado el menor desarrollo del cromatograma (16 cms frente a los 40-50 cms del electroforegrama) las tiras correspondientes a las aplicaciones se cortaron en secciones de 1/2 cm en lugar de 1 cm. En todos los ensayos analíticos, los papeles de electroforesis o el medio cromatográfico se utilizaron tal y como fueron recibidos del proveedor sin tratamiento posterior alguno.

II.3.3. DETECCION DE ANTIBIOTICOS (Y DERIVADOS) NO RADIOACTIVOS EN ELECTROFOREGRAMAS Y CROMATOGRAMAS.

a) Detección de anisomicina y desacetilanisomicina. -

Se ha empleado un reactivo general de aminas secundarias compuesto por una solución de nitroprusiato sódico al 5% en acetaldehído acuoso (al 10%), a la que se añade 1/10 (v/v) de carbonato sódico 20% justo en el momento de su uso. Anisomicina y su derivado desacetilado aparecen como una mancha azul sobre fondo rojo. La sensibilidad del método es buena siendo la aplicación standard de 5×10^{-6} gr.

de antibiótico. Este reactivo ha de ser preparado cada vez, dada la inestabilidad de las soluciones acuosas de nitroprusiato.

Anisomicina puede ser así mismo ser detectada, en un rango muy similar de sensibilidad, por observación directa a la luz ultravioleta. Esto es tan solo válido para cromatogramas en ChromAR Sheet 500 donde han sido eliminados en gran parte compuestos de absorción a bajas longitudes de onda. En el caso de ensayos electroforéticos (papeles Whatman) este método no es recomendable dada su menor sensibilidad.

b) Gougerotina. - Dada su estructura pirimidínica (ver Introducción) este antibiótico es detectado por observación directa a la luz ultravioleta. La sensibilidad de detección varía dependiendo del medio en que se encuentre: 2×10^{-6} gr es más que suficiente en medio ChromAR Sheet 500 pero son necesarias cantidades superiores a los 10^{-5} gr para su localización en papeles Whatman.

c) Antibióticos del grupo de la tricolorina. - Se ha empleado un reactivo general de terpenos. Consiste en usar aldehído anísico y ácido sulfúrico ambos al 5% (v/v) en etanol. Tras sumergir el cromatograma en este reactivo ha de ser calentado a una temperatura de 80°C durante 5 minutos. El producto a revelar aparece como una mancha negra sobre fondo verde-gris, estable durante varias horas. $2,5 \times 10^{-5}$ gramos de antibiótico son suficientes para una perfecta detección.

Este método fué tan solo aplicado a cromatogramas en ChromAR Sheet 500.

II.3.4. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

Esta técnica ha sido de gran utilidad en la determinación de pureza y actividad específica de ^3H anisomicina y ^3H gougierotina (ver Resultados).

Se ha empleado un espectrofotómetro modelo Cary 15 de carta móvil. Se hicieron espectros continuos de las sustancias requeridas en el intervalo 205-320 nm. Se usaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y 1,5 ml de capacidad, capaces de medir en el ultravioleta lejano.

Para determinaciones a una longitud de onda determinada (260 nm para ribosomas) se empleó un espectrofotómetro Gilford modelo 2.400.

II.3.5. ESTIMACION DE MUESTRAS RADIOACTIVAS

Ha sido llevada a cabo indistintamente en un espectrómetro de centelleo líquido modelo Packard TRI-CARB o Nuclear-Chicago Mark II. Las eficiencias de ambos han sido calculadas tan solo en aquellos casos en que fueron requeridas medidas absolutas en desintegraciones por minuto (apartado d).

Las sustancias a medir así como el líquido de centelleo requerido fueron introducidos en viales cilíndricos de 3 ml de capacidad que a su vez eran depositados en viales

(25 ml) suministrados por las casas comerciales para uso directo en el contador. Los líquidos de centelleo empleados fueron:

- a) Muestras en soportes sólidos (papel, filtros etc)..- Butil-PBD al 0,5% en tolueno. Adición: 2-3 ml. En general una cantidad suficiente para cubrir el papel.
- b) Muestras disueltas en acetato de etilo (ver apartados II.3.8 y 9)..- Butil-PBD al 0,5% en tolueno, a los que se añaden 250 ml de metoxietanol por litro de tolueno. Adición, 2 ml. El volumen de acetato de etilo fué de 0,8ml.
- c) Muestras acuosas: volúmenes 1-10 microlitros..- Líquido de centelleo Bray's (Bray, 1960). Compuesto por naftaleno 60 gramos, Butil-PBD 5 gramos, metanol 100 ml etilenglicol 20 ml y dioxano hasta un volumen final de 1.000ml.
- d) Muestras acuosas: volúmenes superiores a 10 microlitros o soluciones ribosómicas..- Líquido de centelleo Bray's CAB-O-SIL (Packard) al 4%. Adición 2,5 ml. Antes de su conteo las muestras han de ser agitadas fuertemente en un agitador del tipo de los llamados "Mixer", durante 30 segundos con objeto de obtener un gel uniforme.

La eficiencia en estas condiciones era en Nuclear Chicago, 92% para carbono 14 y 38% para tritio, mientras que en Packard fueron respectivamente de 85 y 31 %.

II.3.6. GRADIENTES ANALITICOS

Su utilidad en el presente trabajo ha sido: 1) detec-

tar la pureza de las subunidades ribosómicas, 2) las condiciones iónicas óptimas para la disociación de ribosomas 80S y 3) el estado de agregación de los ribosomas en las condiciones de fijación.

Los gradientes del 5 al 30 % en sacarosa, fueron lineales y formados en tubos de nitrato de celulosa de 6 ml de capacidad. Se centrifugaron durante 70 minutos a 150.000g en un rotor SW 50.1 a la temperatura requerida.

Una vez terminada la centrifugación su perfil de densidad óptica fué registrado a 254 nm en un analizador ultravioleta ISCO de célula de flujo continuo equipado con un registro gráfico.

II.3.7. ENSAYO DE SINTESIS DE POLIFENILALANINA DIRIGIDA POR ACIDO POLIURIDICO COMO mRNA.

Este ensayo de polimerización de cadena peptídica ha sido ampliamente utilizado en los últimos años dada su simplicidad y su general aplicabilidad. Tan solo son requeridos poli U (comercial), Fenilalanil-tRNA de facil preparación (II.2.13) y de universal aplicación, ribosomas y un extracto crudo de los factores de polimerización. Así pues, cualquier organismo, órgano o tejido del que puedan ser extraídos ribosomas y factores de polimerización aún en forma cruda puede ser ensayado en su capacidad de sintetizar proteínas.

Hoy día en que los sistemas acelulares van siendo

cada vez más perfeccionados, la síntesis de polifenilalanina está siendo sustituida por ensayos que utilizan mRNA natural y por consiguiente preparaciones mas o menos purificadas de factores de iniciación. No obstante, en aquellas situaciones donde tan solo sea necesario detectar la actividad ribosómica, como en las descritas en esta Tesis, la síntesis de polifenilalanina sigue conservando toda su validez.

Este ensayo es aplicable a cualquier tipo de sistemas con muy ligeras modificaciones. En los que aquí nos ocupan: S.cerevisiae, amígdalas palatinas humanas y E.coli se dan las siguientes características comunes: Ribosomas 1,5mg/ml, poli U 0,1 mg/ml, ^{14}C Fen-tRNA 6,5 pmoles, GTP 1,25mM cloruro magnésico 12 mM y S-100 1/10 del volumen total que en todos los casos fué de 0,1 ml. Las variaciones estriban 1) en la composición de la solución tampón, maleato amónico (pH 6,5) para levaduras y TRIS-ClH (pH 7,4) para humanos y E.coli, siempre a una concentración final 50 mM y 2) en la concentración y naturaleza del ión monovalente: amonio en levaduras y potasio (60 mM) en humanos y (30 mM) en E.coli. Las incubaciones se realizan durante 30 minutos a 30°C (levadura) ó 37°C (humanos y E.coli). Estas se detienen por adición de 2 ml de TCA frio al 5%. Previamente se han de añadir 5 microgramos de albumina bovina (que actua como coadyuvante en la precipitación proteínica).

Antes de filtrar este precipitado es necesario hidrolizar el aminoacil-tRNA que no haya reaccionado para lo que

se calienta el sistema a 90°C durante 15 minutos. Tras enfriar, se filtra a través de filtros Whatman GF/C en los que se estima la radioactividad retenida según se ha descrito en el apartado 5 de esta Sección.

Estos sistemas han sido previamente descritos por : Heredia y Halvorson (1966) el de levadura, Bermek y Matthaei (1970) el de amígdalas palatinas humanas y Nirenberg y Matthaei (1961) el de E.coli.

II.3.8. ENSAYO DE LA "REACCION DE LA PUROMICINA" A PARTIR DEL COMPLEJO N·Ac ¹⁴C FEN·tRNA-POLI U-RIBOSOMAS EN FORMA POSTRANSLOCADA.

La adición de puromicina a este complejo ternario permite estudiar separadamente la reacción de formación de enlace peptídico del resto de las etapas necesarias para el crecimiento de la cadena peptídica. De esta forma se puede estudiar la acción de un inhibidor sobre el enzima responsable de esta reacción y corelacionarlo con los datos de fijación de dicho inhibidor al ribosoma (ver Resultados).

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 0,1 ml: maleato amónico (pH 6,5) 50 mM, cloruro magnésico 12 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM (BFY); 8 microlitros del complejo ternario equivalentes a 28,2 pmoles de N-Ac ¹⁴C Fen-tRNA y 0,1 micromoles de puromicina.

La incubación se realizó a 30°C durante el tiempo requerido. Se detuvo mediante adición de 0,1 ml de sulfato de

berilio (pH 5,5) saturado con sulfato magnésico. El producto de la reacción N.Ac ^{14}C Fen-PM fué extraído con 1 ml de acetato de etilo y estimada su radioactividad según ha sido descrito en el apartado II.3.5 (Leder y Bursztyn 1966). En todos los casos fué sustraída la radioactividad correspondiente a los blancos sin puromicina.

Este mismo tipo de experimentos ha sido realizado con un complejo ternario de las mismas características pero con ribosomas de E.coli considerando las siguientes diferencias:

Condiciones iónicas: TRIS-ClH (pH 7,4) 33 mM, cloruro magnésico 13 mM y cloruro potásico 270 mM (BFB). Incubación: se incubaron el tiempo requerido a 37°C y a 0°C según el tipo de experimento a realizar.

II.3.9. ENSAYO DE LA "REACCION DEL FRAGMENTO"

Ha sido llevado a cabo, al igual que la reacción de la puromicina, con ribosomas eucarióticos de la levadura S.cerevisiae y con ribosomas procarióticos de la bacteria E.coli. Se ha seguido el sistema descrito por Battaner y Vazquez (1971a) y por Monro y Marcker (1967) respectivamente.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 0,1 ml las siguientes condiciones iónicas: TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 20 mM y cloruro potásico 400 mM (FRY) para levadura o TRIS-ClH (pH 7,4) 33 mM, cloruro magnésico 13 mM y cloruro potásico 270 mM (BFB) pa-

ra bacterias, además de 1. mg/ml de ribosomas 0,5 pmoles de C/UACCA ^3H Leu-Ac, 1 mM de puromicina y 33% (v/v) de etanol con el que se iniciaba la reacción. Esta se incubaba a 0°C el tiempo deseado y se detenía y extraía el Ac ^3H Leu-PM según el método de Leder y Bursztyn (1966) descrito en el apartado anterior.

II.3.10. ENSAYOS DE FIJACION DE ANTIBIOTICOS. DIALISIS DE EQUILIBRIO.

Este método, el más natural de todos, está fundamentado en la capacidad que poseen las moléculas de pequeño tamaño o ligandos (antibióticos) de atravesar membranas de diálisis. Así, si a ambos lados de las membranas colocásemos una solución salina, pero tan solo en una el ligando, éste, por difusión, pasará al otro lado hasta que su concentración fuese idéntica en ambos. Sin embargo, si en uno de los lados de la membrana existiese una macromolécula o estructura incapaz de atravesarla (ribosomas) y que poseyera una cierta afinidad por el ligando, sustraería del medio una cierta cantidad de este, siendo necesario un nuevo transporte de ligando desde la solución sin macromolécula para volver a alcanzar el equilibrio. En estas condiciones la diferencia de ligando entre ambos lados de la membrana nos daría la medida directa del que se encuentra fijado a la macromolécula.

Experimentalmente se han utilizado unas cámaras de diálisis de leucita que permitían colocar cantidades de 0,05-2 ml en unos compartimentos situados a ambos lados de la

membrana de fácil acceso desde el exterior, lo que facilitaba enormemente la operación de toma de muestras. Durante el proceso de diálisis estos compartimentos quedaban herméticamente cerrados, evitando cualquier efecto de evaporación, muy sensibles en los límites normales de trabajo 0,1 ml (a ambos lados). La membrana utilizada fué tubo Visking 8/32 previamente hervido con solución de carbonato sódico al 10%. Tras repetidos lavados con agua desionizada eran conservados en solución 0,1 mM de EDTA a 4°C.

La diálisis se llevó a cabo en un baño termostato del mismo material que las cámaras. Estas eran introducidas en un "container" capaz de deslizarse a lo largo de dos pequeños rieles colocados transversalmente dentro del baño. Este "container" era agitado de forma constante en la dirección perpendicular a la membrana de diálisis merced a una biela acoplada a un pequeño motor eléctrico.

Mediante este sencillo dispositivo se logró que las condiciones de agitación fueran idénticas en cada cámara, dando una uniformidad total al experimento.

II.3.11. ENSAYOS DE FIJACION DE ANTIBIOTICOS. METODO DE ULTRACENTRIFUGACION.

En este caso la separación física de ribosomas respecto del antibiótico se realiza mediante la fuerza centrífuga que hace que la macromolécula se desplace hasta el fondo

del tubo quedando allí sedimentada, mientras que el ligando permanece en solución uniformemente distribuido. Sin embargo cuando ambos, ribosoma y antibiótico, se centrifugan conjuntamente, en virtud de su afinidad mutua una determinada proporción del inhibidor sedimentará unida a la fracción ribosómica. Así la cantidad de ligando fijado vendrá dada por la diferencia existente entre la solución inicial y el sobrenadante resultante tras la centrifugación.

Durante este ensayo la concentración de ribosomas no permanece constante, lo que en un principio podrá alterar el equilibrio antibiótico-ribosomas. Sin embargo los resultados experimentales obtenidos con este método han sido siempre idénticos a los conseguidos mediante diálisis de equilibrio.

Las condiciones experimentales han sido para ribosomas: Centrifugación a 38.000 rpm (velocidades superiores causaban eventual aplastamiento de los tubos) durante dos horas a la temperatura requerida, y para subunidades ribosómicas: idem, excepto 6 horas.

Se han utilizado rotores de 12 huecos (Beckman/Spinco modelo 50 Ti o 40) en los que se introducían mediante adaptadores 24 tubos (como máximo) de nitrato de celulosa de 0,6 ml de capacidad (Beckman).

Dada la mayor simplicidad de este método ha sido empleado en la mayor parte de los experimentos limitándose el uso de la diálisis de equilibrio en experimentos con-

trol (ver Resultados).

II.3.12. ENSAYOS DE FIJACION DE ANTIBIOTICOS. METODO DE PRECIPITACION POR ETANOL

Con objeto de correlacionar la acción de inhibidores sobre el centro peptidil transferasa (ensayado según la reacción del fragmento) con su afinidad por el ribosoma, la interacción entre ambos hubo de ser estudiada en tales condiciones iónicas.

Una concentración de etanol al 33% (v/v) provoca la precipitación de los ribosomas pero no del antibiótico. Así, este método es sustancialmente idéntico al descrito en el apartado anterior. En aquel había que someter a la macromolécula durante un cierto tiempo a un elevado número de g con objeto de sedimentarla y separarla del antibiótico no unido, mientras que en este, una ligera centrifugación (generalmente 10 minutos a 30.000 g) resulta suficiente. Por lo demás, el resto de la técnica operativa es idéntico a la descrita para el método de ultracentrifugación.

II.3.13. CONDICIONES EXPERIMENTALES

Los ensayos de fijación han sido realizados (mientras no se especifique lo contrario) en las soluciones tampón siguientes:

Fijación a ribosomas de levadura.- Condiciones standard, BFY: Maleato amónico (pH 6,5) 50 mM, cloruro

magnésico 12 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM. Condiciones de la reacción del fragmento, FRY: TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 20 mM y cloruro potásico 400 mM.

Fijación a ribosomas de amígdalas palatinas humanas.- Condiciones standard BFH: TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 11 mM, cloruro potásico 60 mM y 2-mercaptoetanol 7 mM.

Fijación a ribosomas de *E. coli*. - Condiciones standard, BFB: TRIS-ClH (pH 7,4) 33 mM, cloruro magnésico 13 mM y cloruro potásico 270 mM. Condiciones de la reacción del fragmento, BFB(E): idéntica composición pero en solución de etanol al 33% (v/v).

Las cantidades empleadas tanto de ribosomas como de antibiótico radioactivo en los ensayos de determinaciones cuantitativas serán descritas, dada su variabilidad, en los correspondientes apartados de Resultados.

Sin embargo en los experimentos de inhibición de la fijación de un antibiótico por otros inhibidores, así como en los ensayos de condiciones óptimas de fijación (variación de las soluciones tampón descritas más arriba) las condiciones empleadas fueron:

Fijación de ^3H anisomicina. - Ribosomas de *S. cerevisiae* $2,5 \times 10^{-6}$ M ó $3,5 \times 10^{-6}$ M para ribosomas humanos, mientras que la concentración de ^3H anisomicina fué siempre de 10^{-6} M. Todo ello en un volumen final de 0,1 ml del que eran tomadas alícuotas de 0,025 ml para estimación

de radioactividad, antes y después de la centrifugación.

Fijación de ^3H gougerotina. - Ribosomas de *S. cerevisiae* y de *E. coli* $3,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ y 10^{-6} M para ^3H gougerotina. Volumen final y alícuotas para radioactividad como en el apartado anterior.

Fijación de ^{14}C tricodermina. - Ribosomas de *S. cerevisiae* y de amígdalas palatinas humanas $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$. ^{14}C tricodermina $3 \times 10^{-6} \text{ M}$. El resto como en apartados anteriores.

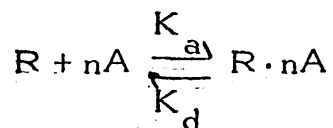
La técnica de ultracentrifugación ha sido empleada para estos experimentos. En aquellos otros en los que el etanol estuvo presente en condiciones variables (ver Resultados) se siguió dicha técnica tan solo para proporciones inferiores al 20% (v/v) y la sedimentación por etanol para las superiores. El resto de las condiciones fué tal y como se describe mas arriba.

II.3.14. CALCULOS

La interacción de un antibiótico con un ribosoma (en general un ligando con una macromolécula) cumple las leyes de los equilibrios ácido-base (para un tratamiento completo ver Edsall y Wyman, 1958) obteniéndose para el caso de un tipo único de fijación la expresión:

$$\bar{y} = \frac{nK_a (A)}{1 + K_a (A)}$$

donde K_a es la constante de asociación del equilibrio



cuyo valor inverso $\frac{1}{K} = K_d$ es la constante de disociación que será la comúnmente empleada a lo largo del presente trabajo. \bar{Y} nos da el grado de saturación, es decir los moles de antibiótico unidos por mol de ribosoma. (A) es la concentración de antibiótico libre en el equilibrio y n el número de sitios de fijación de antibiótico en el ribosoma.

Cuando existen m tipos distintos de fijación, la expresión anterior se generaliza en la forma:

$$\bar{Y} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i K_{a_i} (A)}{1 + K_{a_i} (A)}$$

donde un tipo de fijación m_i posee n_i moléculas de ligando por ribosoma, todas ellas equivalentes e independientes y con una afinidad dada por su correspondiente constante de asociación K_{a_i} .

De las múltiples representaciones gráficas en que pueden ser expresadas las ecuaciones anteriores (Edsall y Wyman, 1958) hemos escogido la dada por Scatchard (1949) por ser estadísticamente la más fideligna.

En ella se cumple que:

$$\lim_{(A) \rightarrow 0} \frac{\bar{Y}}{(A)} = \sum_{i=1}^m n_i K_i \quad \text{y} \quad \lim_{(A) \rightarrow \infty} \bar{Y} = \sum_{i=1}^m n_i$$

es decir que si los distintos m tipos de fijación son realmen-

te independientes entre sí, así como los distintos sitios de fijación n_i se obtendrá una serie de m rectas a partir de las cuales pueden calcularse directamente sus correspondientes valores de n (intersección con el eje de abscisas) y de K_a (pendiente de la recta cambiada de signo). Cualquier desviación de la linealidad de estas rectas implicará que las suposiciones de independencia hechas mas arriba no se cumplen experimentalmente.

Un estudio mas detallado y completo de los apartados II.3.10 a II.3.14 ha sido llevado a cabo por Fernández-Muñoz en los trabajos de referencias: Fernández-Muñoz, Monro y Vázquez (1971), Fernández-Muñoz y cols. (1971) y especialmente en su Tesis Doctoral (1971) (Facultad de Farmacia, Universidad de Madrid).

CAPITULO III

- III.1 PREPARACION DE ^3H ANISOMICINA
- III.2 PREPARACION DE ^3H GOUEROTINA
- III.3 OBTENCION DE ^{14}C TRICODERMINA

III.1. PREPARACION DE ^3H ANISOMICINA

III.1.1. PROCESO DE MARCAJE

Este proceso, dadas sus características técnicas especialmente las altas cantidades de radioactividad manejadas, no ha sido posible realizarlo en nuestro laboratorio. No obstante y puesto que es el punto de partida de esta Tesis creo interesante su inclusión. Se enviaron 100 mg del antibiótico al servicio de Química Orgánica del Radiochemical Centre (Amersham, Inglaterra) donde fueron tratados de la siguiente forma: se mezclaron con 100 mg del catalizador de Adams en su forma reducida a los que se añadieron 3 ml de agua tritiada con un contenido en radioactividad de 300 Ci. Esta mezcla se introdujo en una ampolla que fué cerrada al vacío y posteriormente calentada a una temperatura entre 90 y 100°C durante 16 horas. Trascurrido este tiempo se eliminó el exceso de agua tritiada por liofilización y el residuo sólido fué redisolto en 25 ml de una solución acuosa de ácido clorhídrico diluído (alrededor de pH 5) y filtrado para eliminar el catalizador. La solución, que contenía un total de 115 mCi, será denominada a lo largo de esta Tesis "crudo radioactivo".

III.1.2. DETECCION DE ^3H ANISOMICINA EN EL CRUDO RADIOACTIVO.

Cualesquiera de los métodos empleados en la detec-

ción de posible ^3H anisomicina existente en el crudo radioactivo han de considerarse tan solo a modo informativo ya que, logicamente, ninguno de ellos será enteramente específico. Si a esto unimos las consideraciones hechas en Discusión acerca de la naturaleza de los productos contaminantes, se comprenderá que los resultados expuestos en este apartado solo tendrían carácter definitivo en el caso que resultasen negativos.

De la misma forma, detecciones basadas en principios enteramente distintos serán mayor garantía de existencia del antibiótico radioactivo. Para ^3H anisomicina se han empleado:

a) anillos de inhibición del crecimiento de la levadura *S.cerevisiae*.

b) Inhibición de la síntesis de polifenilalanina en un sistema acelular de este microorganismo.

c) Perfil electroforético del crudo radioactivo.

En los dos primeros casos se trazó previamente una curva patrón y por interpolación de unas cantidades conocidas de crudo radioactivo, se calculó la existencia de ^3H anisomicina. Los resultados (Fig. III.1) fueron muy dispares. Así en el caso de anillos de inhibición de crecimiento, considerando que todo el producto con actividad antibiótica fuese ^3H anisomicina se encontraría en una proporción del 9%. Sin embargo haciendo el mismo tipo de consideraciones para el segundo de los ensayos, tan solo existiría un 1,5%

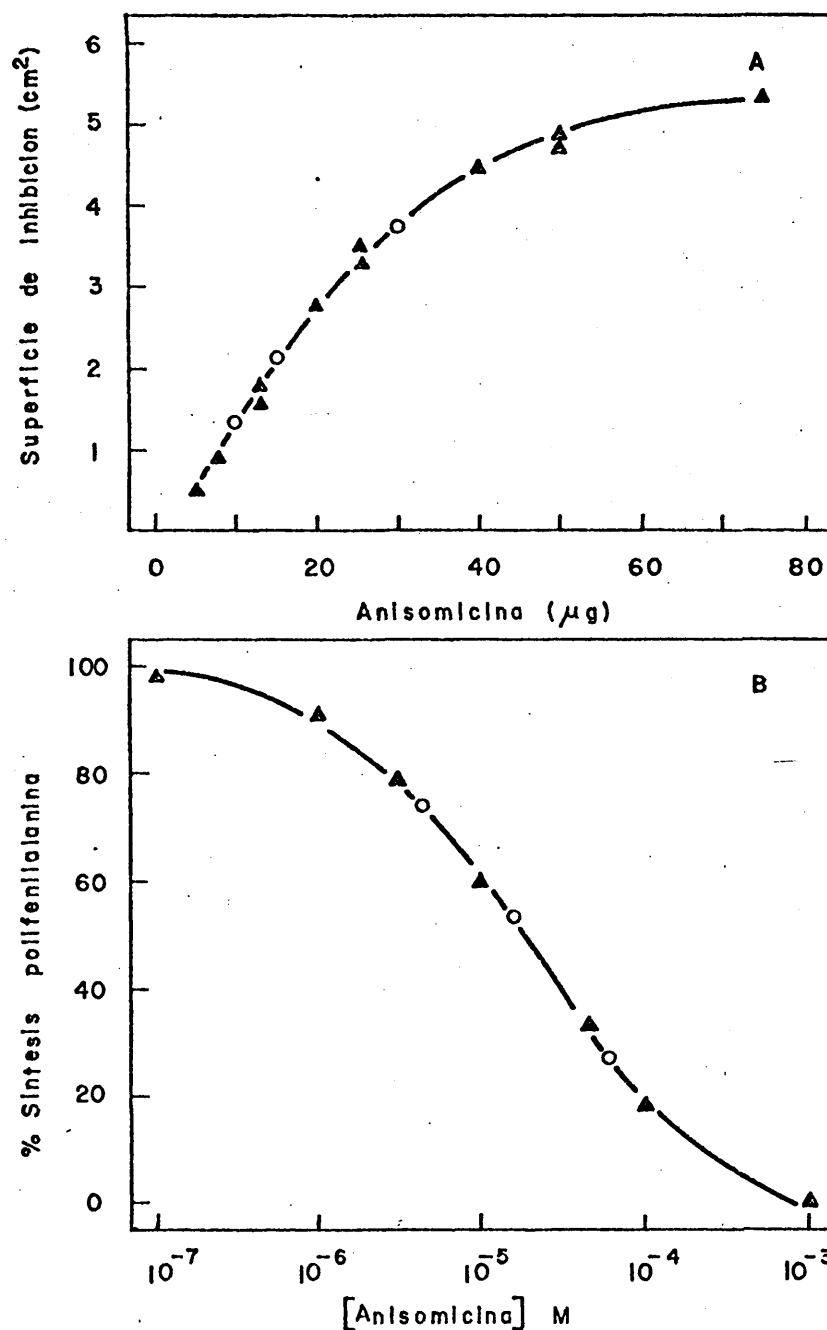


FIG.III.1. Determinación del contenido de ^3H anisomicina en el crudo radioactivo.

- A. Anillos de inhibición del crecimiento de la levadura *S.cerevisiae* sobre agar.
- B. Inhibición de la síntesis de polifenilalanina en un sistema acelular de levadura.

Los círculos blancos (o) corresponden a la interpolación del resultado obtenido con determinadas cantidades del crudo radioactivo.

del antibiótico en el crudo radioactivo.

El tercer método se fundamenta en la especificidad que presenta la movilidad electroforética de anisomicina en ciertas condiciones (ver apartado III.1.3). Así en una solución tampón compuesta por trietanolamina 50 mM-ClH (pH 8,6) (siendo 90 V/cm y 1 hora el resto de las condiciones experimentales empleadas), un crudo radioactivo standard presenta 4 máximos de radioactividad perfectamente definidos. El primero de ellos en el origen del electroforegrama y los otros tres M1, M2 y M3 a unas distancias de 11, 20 y 32 cms, respectivamente, hacia el cátodo (Fig. III.2). La presencia del máximo M2 es indicativa de existencia de ^3H anisomicina.

Hay que considerar que esta zona del electroforegrama descrita como M2 contiene además otros productos de degradación, sin embargo se ha comprobado que presentan unas características de estabilidad enteramente paralelas a las del antibiótico.

Este método es a lo sumo estimativo no pudiendo ser considerado en ningún caso como cuantitativo. No obstante, aventaja considerablemente a los anteriores en facilidad de realización y en la mínima cantidad de crudo radioactivo necesario: 2×10^{-3} ml.

III.1.3. ESTUDIOS SOBRE LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA DE ANISOMICINA

Se ha estudiado la movilidad electroforética de aniso-

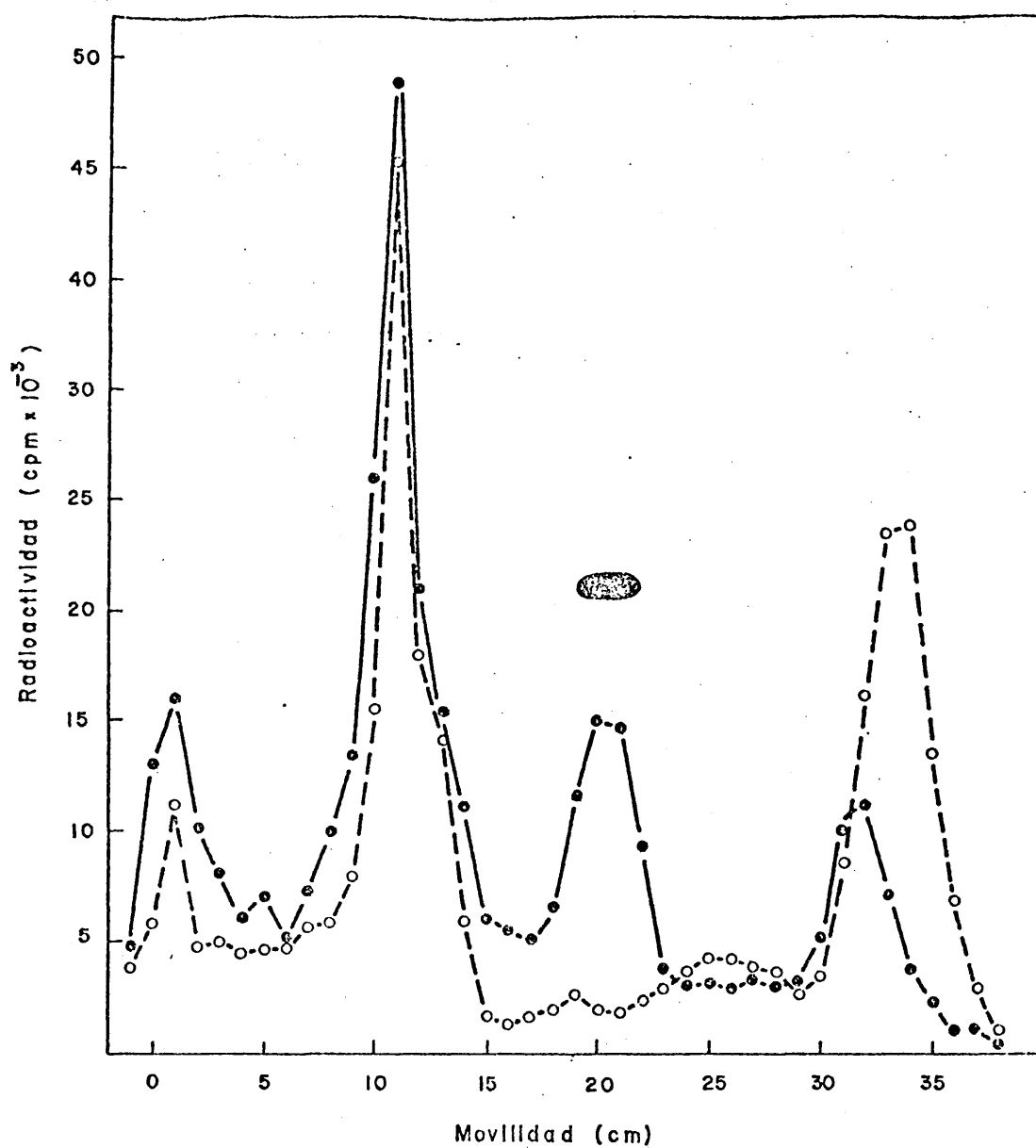


FIG.III.2. Perfil electroforético del crudo radioactivo de ^3H anisomicina (2×10^{-3} ml).

Condiciones experimentales: 90 V/cm durante 1 hora en trietanolamina 50 mM-ClH (pH 8,6)

●—● Crudo radioactivo con ^3H anisomicina

o---o Crudo radioactivo sin ^3H anisomicina

micina en un rango de pH comprendido entre 5,5 y 10,5 unidades (pK_a (anisomicina) = 7,9). Ante tan amplio margen, hubieron de utilizarse diversas soluciones tampón. Las condiciones experimentales que aparecen entre paréntesis han sido las empleadas en esta Tesis mientras no se especifique lo contrario..

| | | |
|-----------|-----------------------------|----------------------|
| 5,5-7,6: | Cacodilato sódico 50 mM-CIH | (45 V/cm y 1 hr) |
| 7,2-8,6: | TRIS 50 mM-CIH | (60 V/cm y 1 hr) |
| 8,4-9,8: | Trietanolamina 50 mM-CIH | (90 V/cm y 1 hr) |
| 9,5-10,5: | Etanolamina 50 mM-CIH | (60 V/cm y 3 1/2 hr) |

Para aquellos valores de pH comprendidos en los intervalos de dos soluciones tampón, ambas fueron empleadas, obteniéndose idénticas movilidades.

Los resultados aparecen expresados en la figura III. 3. En ella existen 3 zonas claramente diferenciadas. A valores de pH inferiores a 7,5 nos encontramos con la velocidad migratoria máxima de la molécula, que corresponde a un estado de plena carga. El valor absoluto de esta movilidad es $1,4 \times 10^{-4}$ cm/V.seg y fué tomada como 100%.

A medida que se aumenta el pH el valor de la movilidad de anisomicina decrece según una relación lineal (intervalo pH 7,5-9,0). Sin embargo a partir de pH 9,0 aparece una segunda pendiente y puesto que anisomicina posee un único grupo ionizable (el anillo pirrolidínico) su presencia debe ser explicada sobre la base de un efecto de inducción producido por el tampón (Zweig y Whitaker, 1967).

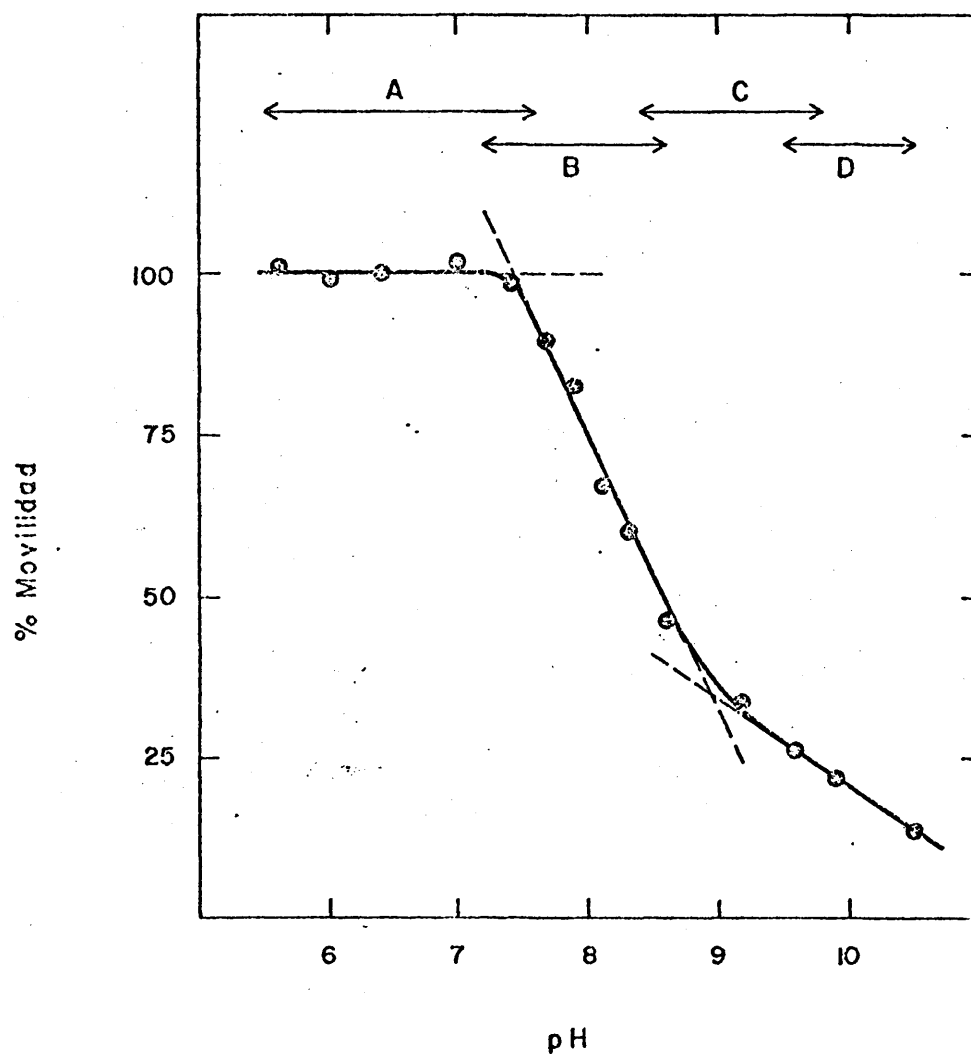


FIG.III.3. Movilidad electroforética de anisomicina. Dependencia del pH.

- | | | |
|----|-----------------------------|-----------------|
| A. | Cacodilato sódico 50 mM-CIH | 1 hr, 45 V/cm |
| B. | Tris 50 mM-CIH | 1 hr, 60 V/cm |
| C. | Trietanolamina 50 mM-CIH | 1 hr, 90 V/cm |
| D. | Etanolamina 50 mM-CIH | 3,5 hr, 60 V/cm |

100% de movilidad corresponde a $1,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}.\text{seg}$

Estas dos pendientes van a ser de gran utilidad en el proceso de purificación de ^3H anisomicina.

Se comprobó que en aquellas condiciones en que la movilidad del antibiótico es 100%, esta dista mucho de ser específica y el grado de purificación obtenido es bastante mediocre. Sin embargo a medida que la carga iónica del anillo pirrolidínico va siendo neutralizada, anisomicina va adquiriendo un notable incremento de especificidad siendo "teóricamente" total a aquellos valores de pH correspondientes a la segunda pendiente de la figura III.3 (pH mayor de 9,0).

El entrecomillado de la palabra teóricamente se debe a que si bien a pH 10 anisomicina, como tal sustancia posee una movilidad electroforética totalmente específica (ver pie de página), cuando se encuentra en el crudo radioactivo tal significado pierde su intrínseca validez dadas las múltiples interacciones entre los contaminantes, lo que disminuye considerablemente su resolución. Todo ello sin contar con la enorme cantidad de radioactividad distribuida inespecíficamente a lo largo del electroforegrama. Resumiendo, esta especificidad a pH 10,0 podría ser válida desde un punto de vista analítico pero nunca con fines preparativos.

La figura III.4 presenta los perfiles electroforéticos del crudo radioactivo en las condiciones de:

Máxima movilidad (III.4.A) cacodilato sódico-ClH (pH 6,0) y 2 horas; primera pendiente (III.4.B) trietanol-

NOTA. Esta afirmación ha sido comprobada "a posteriori" una vez que ^3H anisomicina fué obtenida en forma totalmente pura (ver III.1.7).

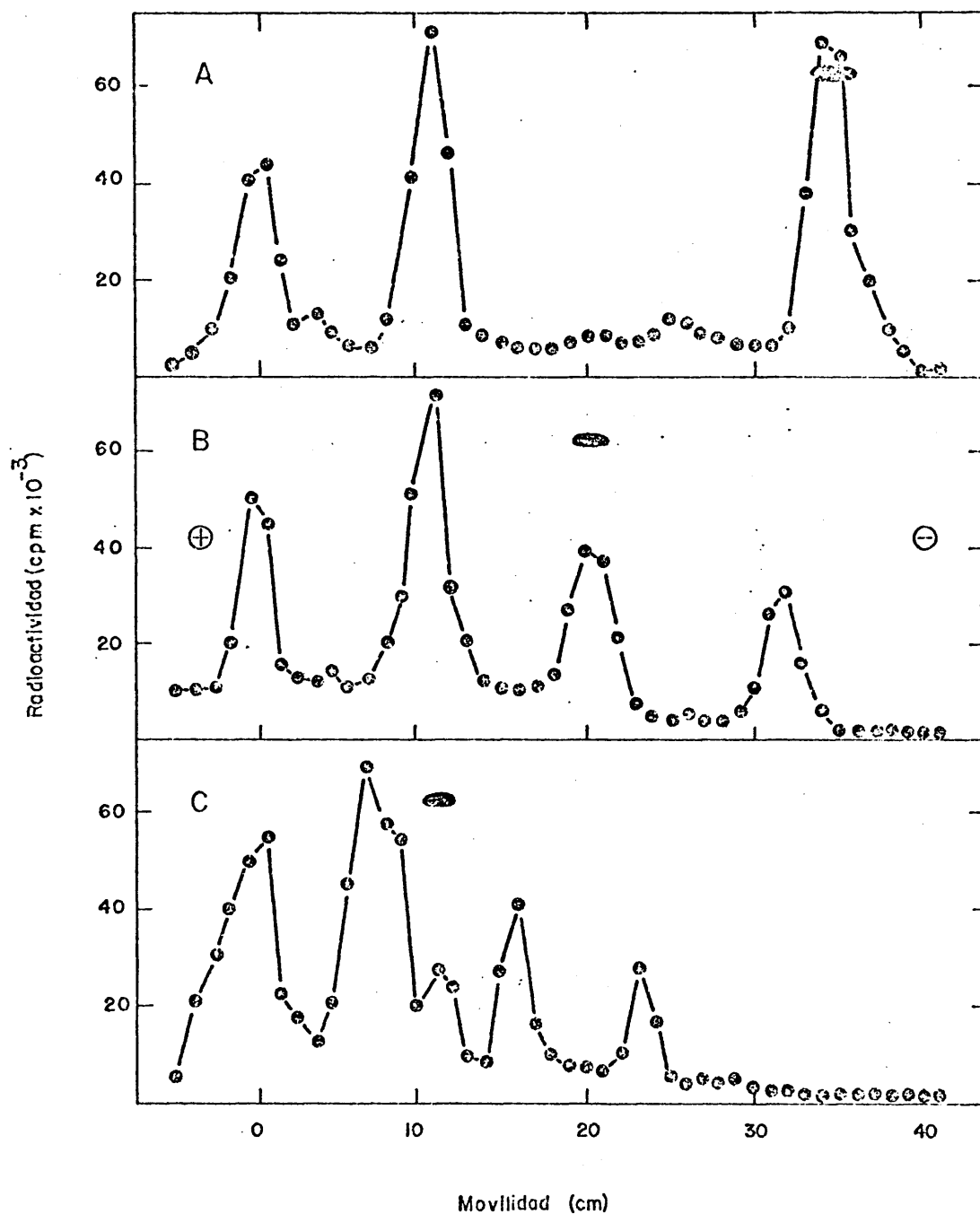


FIG.III.4. Perfil electroforético del crudo radioactivo de ^3H anisomicina.

A. Cacodilato sódico 50 mM-CIH (pH 6,0) y 2 hr.

B. Trietanolamina 50 mM-CIH (pH 8,6) y 1 hr.

C. Etanolamina 50 mM-CIH (pH 10,0) y 1,5 hr.

Voltajes como en Figura III.3. Aplicación 2×10^{-3} ml.

amina-ClH (pH 8,6) y 1 hora; segunda pendiente (III.4.C) etanolamina-ClH (pH 10,0) y 1,5 horas. En esta experiencia se han variado los tiempos de corrida (manteniendo constantes los voltajes) con objeto de hacerlo comparativo con las condiciones en B (90 V/cm y 1 hora) tomadas como unitarias.

Las manchas negras representan los controles de anisomicina no radioactiva. Una vez apuntados los problemas planteados en una purificación en un solo paso quedaba la posibilidad de realizarla mediante dos ó más etapas. Se determinó que el pico de radioactividad correspondiente a anisomicina en A (pH 6,0) se desdobra en los dos picos de máxima movilidad presentes en B (pH 8,6) mientras que los otros dos (en el origen y a 12 cms de este) permanecen insensibles a esta variación de condiciones experimentales. Así mismo se comprobó que la pureza del pico correspondiente a anisomicina en B (pH 8,6 y movilidad 20-22 cms) no presentaba diferencias si se aislaba directamente en estas condiciones ó a partir del pico de máxima movilidad según A (pH 6,0) purificado previamente.

Así una vez obviado el paso AB quedaba por saber si BC resultaría o no definitivo. Para ello se aisló a escala semipreparativa (0,1 ml de crudo radioactivo en papel Whatman 3 MM) la radioactividad de movilidad 20-22 cms en las condiciones descritas para pH 8,6 (máximo M2 en figura III.2) y se corrió en las correspondientes a pH 10.0. El resultado aparece en la figura III.5. La zona punteada

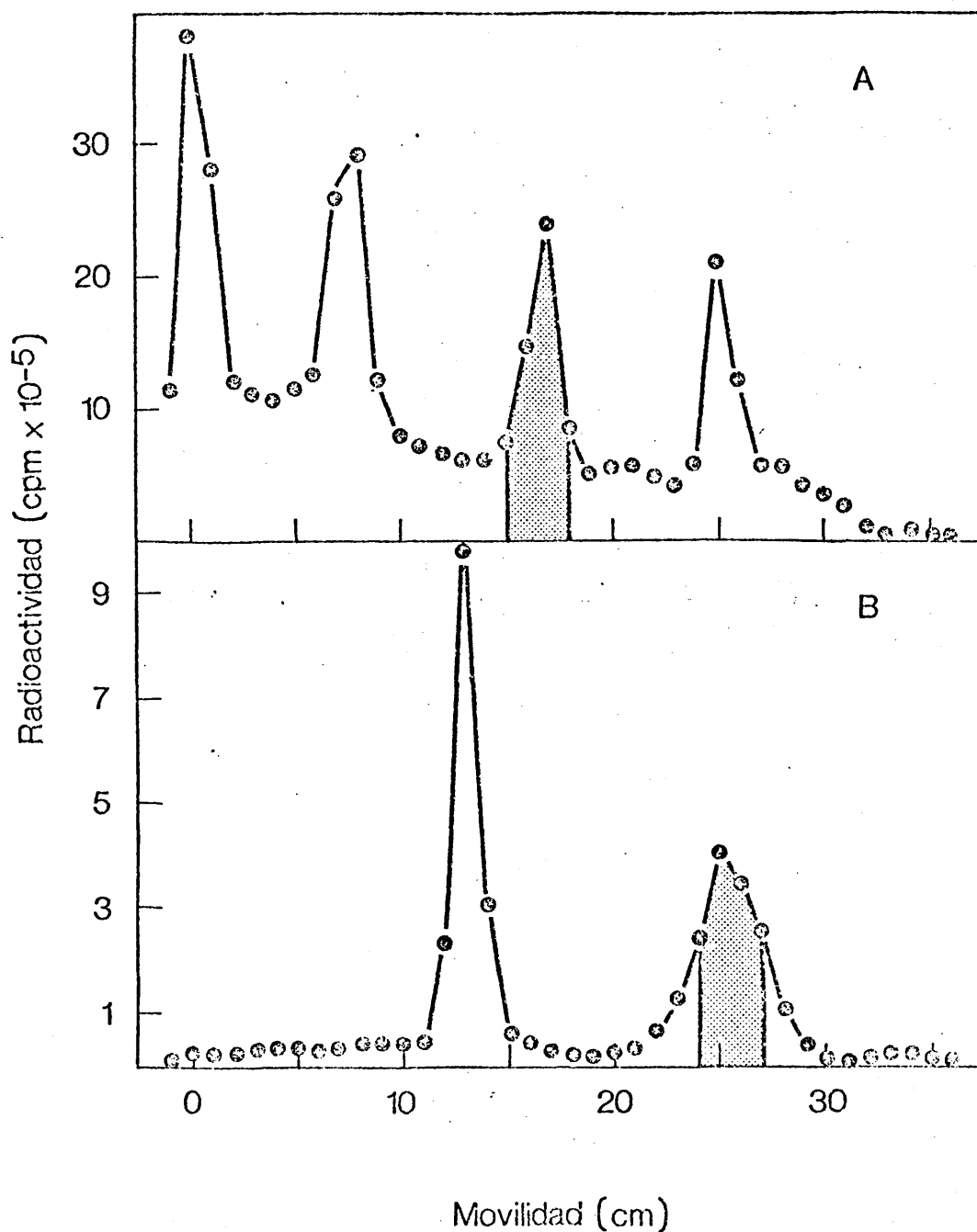


FIG.III.5. Purificación (escala semipreparativa) de ^3H anisomicina. Electroforesis de alto voltaje.

- A. Trietanolamina (50 mM)-CIH (pH 8,6), 90 V/cm 1 hora. La zona punteada fué eluida y aplicada a:
- B. Etanolamina (50 mM)-CIH (pH 10,0), 60 V/cm y 3,5 hrs. En ambas casos sobre Whatman 3 MM.

en la parte inferior de la figura resultó ser ^3H anisomicina pura según criterio electroforético.

Así pues este método de purificación en dos etapas (electroforesis a pH 8,6 y pH 10,0) parecía idóneo. Sin embargo tan prometedores resultados en la escala semipreparativa no tuvieron correspondencia cuando se intentó la purificación de 2,5 ml de crudo radioactivo (equivalentes a 10 mg de anisomicina original). La resolución a pH 8,6 fue muy inferior, apareciendo interferencias entre los máximos de radioactividad. Esto es, al purificar M2 y volverlo a correr en las mismas condiciones pero a escala analítica, aparecían contaminaciones (incluso superiores al 10%) de M1 y M3. Esto influyó en el grado de pureza conseguido tras la segunda electroforesis (pH 10,0) ya que en ningún caso se consiguió superar el 85%.

Dado que el método era teóricamente correcto (resultados analíticos o semipreparativos) se pensó en sustituir el primer paso (electroforesis a pH 8,6) por una técnica de similar fundamento y de una mas amplia capacidad preparativa: cromatografía en columna de intercambio iónico utilizando una resina cambiadora de cationes (carboxi-metil celulosa).

III.1.4. ETAPAS DE PURIFICACION.

COLUMNA DE INTERCAMBIO IONICO

Todas las etapas de la purificación de ^3H anisomicina fueron realizadas a la temperatura de 0-4°C mientras no

se especifique lo contrario.

Se tomaron 10 ml de crudo radioactivo equivalentes a 40 mg de anisomicina inicial y se liofilizaron. El residuo fué redissuelto en 4 ml de solución tampón inicial, carbonato amónico 2 mM, pH 8,6 (con la que había sido previamente estabilizada la columna de CM-celulosa, II.2.1) y aplicados en la parte superior del lecho cromatográfico. Se pasaron a continuación 150 ml de solución inicial con objeto de eluir de la columna toda aquella radioactividad no retenida que resultó ser un 45% del total. Esta operación fué seguida por la elución de los compuestos retenidos, mediante 320 ml de un gradiente lineal de la misma composición, esto es carbonato amónico, desde 2 mM hasta una concentración 50 mM manteniendo constante el pH.

Finalmente 100 ml de carbonato amónico 250 mM sirvieron para eluir de la columna cualquier radioactividad residual que permaneciera aún unida, quedando así regenerada para nuevo uso previa estabilización con solución tampón inicial.

Otras condiciones experimentales fueron: flujo de salida de la columna 100 ml/hora recogándose fracciones de 7,5 ml, que contenían 1,5 milimoles de ácido fórmico con objeto de disminuir el pH del eluido y evitar innecesarias degradaciones del antibiótico.

El perfil de radioactividad (Fig. III.6) fué determinado tomando alícuotas de 3×10^{-3} ml de cada fracción, tal y como se describió en Métodos (II.3.5). Puede observar-

se un gran paralelismo con el perfil electroforético obtenido en las mismas condiciones de alcalinidad, (ver Fig. III.2 ó Fig. III.4.B) pues si bien el pico M1 es eluido con la solución inicial debido a su debil carga positiva, aparece ligeramente retrasado de aquellos productos sin carga alguna que eluyen en el frente y que se corresponden con el pico en el origen del electroforegrama.

A pesar de estas similitudes se hizo necesario identificar cuales de estas fracciones contenían ^3H anisomicina. El método empleado fué el electroforético (cuyas ventajas han sido descritas en III.1.2) bajo aquellas condiciones de máxima resolución y especificidad para el antibiótico, esto es solución tampón trietanolamina 50 mM-CIH (pH 8,6) 90 V/cm durante 1 hora y etanolamina 50 mM-CIH (pH 10,0) 60 V/cm durante 3 1/2 horas. Las fracciones ensayadas correspondieron a la radioactividad eluida a las concentraciones de 10-12 mM, 20-25 mM y 30-32 mM de carbonato amónico.

Los resultados gráficos expresados en la figura III.6 son de por sí explicativos. Las fracciones 10-12 mM y 30-32 mM no contienen en absoluto ^3H anisomicina, demostrándose al mismo tiempo la identidad del pico de máxima carga positiva (eluido en última posición) con M3 (máxima movilidad en estas condiciones). Las manchas negras representadas en los electroforegramas corresponden a los controles de anisomicina no radioactiva.

En cuanto al pico central se ensayaron por separado su parte anterior (fracciones 43-44), central (45-46) y

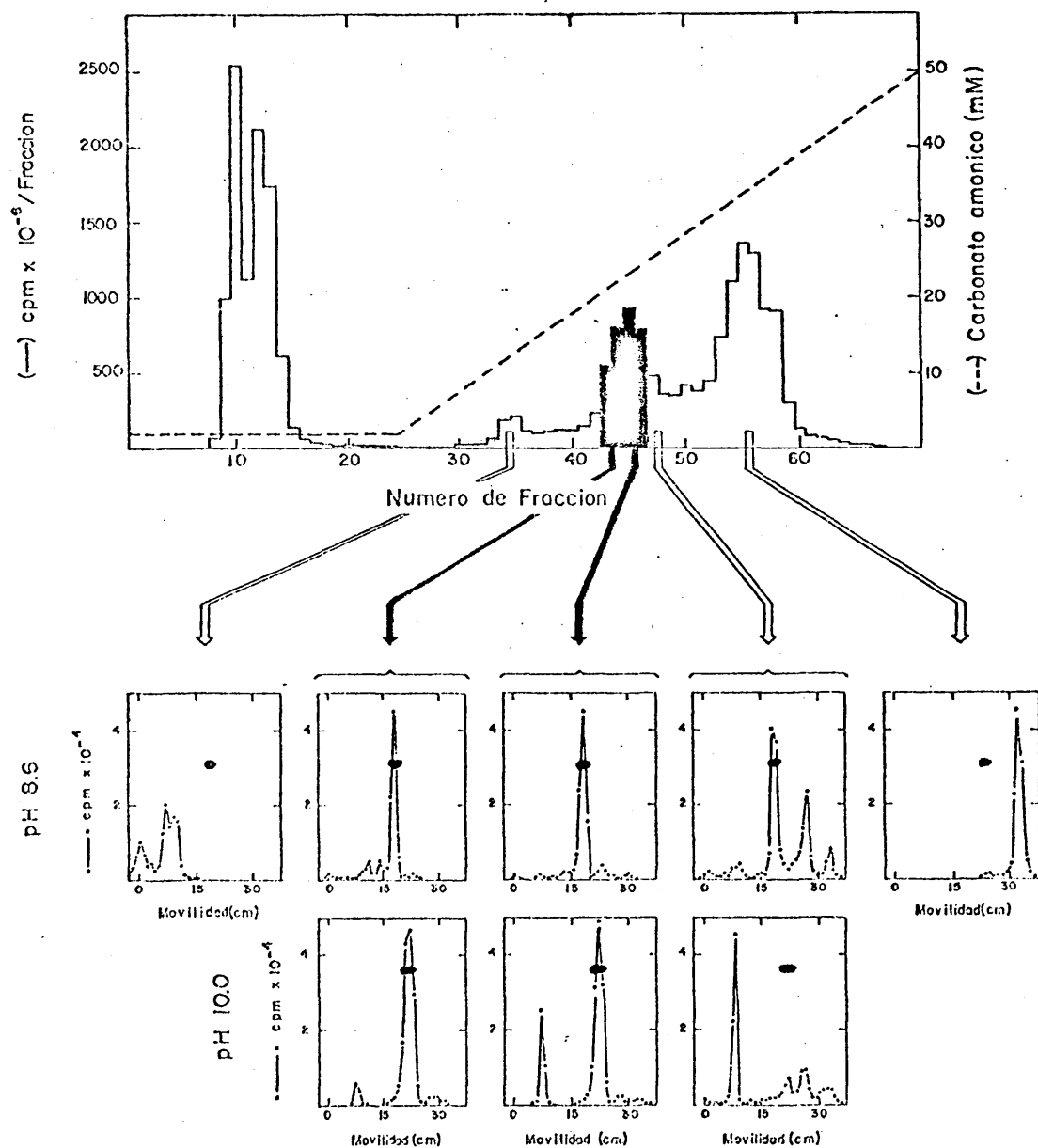


FIG.III.6. Purificación de ^3H anisomicina. Cromatografía en columna sobre CM-celulosa.

Parte superior: Perfil de radioactividad del eluido
 Parte inferior : Identificación de las fracciones conteniendo ^3H anisomicina por electroforesis

Fracciones 43-46 (en negro) fueron tomadas para continuar la purificación.

posterior (47-48), observándose que según el ensayo a pH 8,6 las tres contenían ^3H anisomicina, si bien la fracción mas pura era logicamente la central. Sin embargo el análisis a pH 10,0 reveló de forma inequívoca que la parte posterior del pico tenía una proporción mínima del antibiótico por lo que fué descartado.

Así se tomaron las fracciones 43-46 (en negro en la Fig. III.6) y se liofilizaron con objeto de ser corridas electroforéticamente en la segunda etapa de purificación.

Previamente al proceso preparativo, se realizaron pruebas analíticas con objeto de encontrar las condiciones óptimas de elución. Para ello se aplicaron a la misma columna empleada en la purificación 0,1 ml de crudo radioactivo y una cantidad suficiente de anisomicina no radioactiva para poder ser detectada por espectroscopía ultravioleta. Cuando las condiciones experimentales fueron las descritas mas arriba, se encontró que el perfil de radioactividad era idéntico al obtenido posteriormente a escala preparativa, así como las fracciones en las cuales eluye el antibiótico.

III.1.5. ETAPAS DE PURIFICACION.

ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE.

El material obtenido en el apartado anterior, 13% de la radioactividad inicial, fué redisuelto en un mínimo volumen de agua destilada y aplicado sobre una tira de papel Whatman 17 tal y como se ha descrito en Métodos (II.2.2).

La electroforesis fué llevada a cabo en solución tampón de etanolamina-ClH (pH 10,0) aplicando una diferencia de potencial de 40 V/cm durante 4 1/2 horas. La disminución del voltaje aplicado se debe a la elevada conductividad que presentan los papeles preparativos (Whatman 17) respecto de los analíticos dada la mayor cantidad de tampón que absorben.

El perfil de radioactividad aparece en la figura III.7 según fué deducido de los controles laterales. Las zonas a eluir, en este caso la comprendida entre 25 y 27 cms de distancia del origen hacia el cátodo (en negro en la figura) vienen marcadas por los controles paralelos de anisomicina no radioactiva. Es conveniente tomar la zona correspondiente al centímetro anterior y posterior por si algun efecto de distorsión hubiera provocado diferencias de movilidad entre la zona central y las laterales. La elución (II.2.4) se realizó con ácido fórmico 10 mM (con objeto de mantener el pH siempre inferior a 6,5) durante toda la noche. Los 9-10 ml de eluido fueron liofilizados y redisueltos en 0,25 ml de ácido clorhídrico 10 mM.

Con objeto de comprobar la pureza de la preparación de ^3H anisomicina, fué analizada en las distintas condiciones electroforéticas descritas en III.1.3, encontrándose pura en todos los casos excepto a pH 8,6 donde apareció una contaminación ligeramente inferior al 5%.

Independientemente de este tipo de criterio resulta muy conveniente en toda purificación emplear como ensayos de

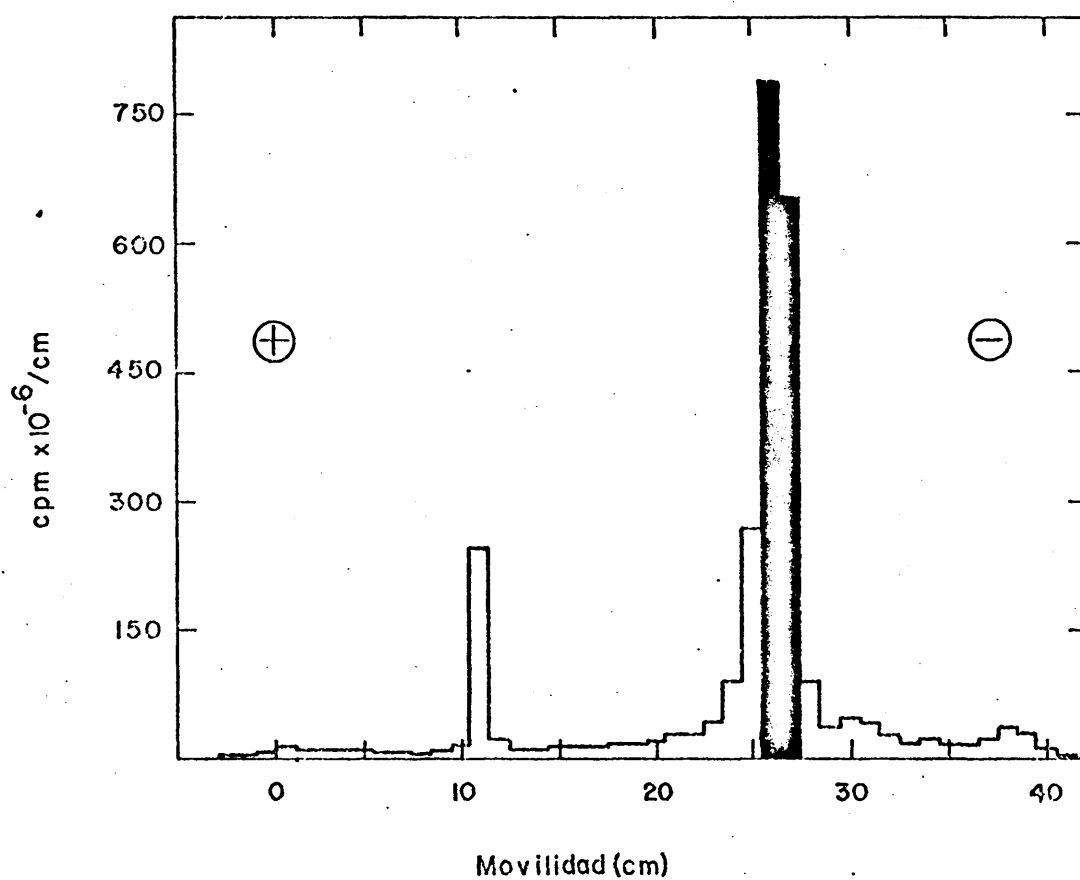


FIG.III.7. Purificación de ^3H anisomicina. Fracciones 43-46 de la columna de CM-celulosa. Electroforesis de alto voltaje.

Condiciones experimentales: Whatman nº 17, etanolamina 50 mM-ClH (pH 10,0), 40 V/cm durante 4 1/2 horas. El material de movilidad 25-27 cms (en negro) fué eluido para la siguiente etapa de purificación.

pureza otros cuyos fundamentos sean totalmente distintos de los hasta ahora expuestos.

III.1.6. ETAPAS DE PURIFICACION.

CROMATOGRAFIA SOBRE ACIDO SILICICO-FIBRA DE VIDRIO.

Se desarrollaron una serie de solventes siendo tres los utilizados:

Solvente 1.- sec-butanol : bencina de petróleo 40-60°C : amoniac 2 N (25:5:4)

Solvente 2.- n-butanol:agua:ácido acético (60:10:3)

Solvente 3.- etanol:agua (1:1) en atmósfera de cloroformo.

En ninguno de ellos pudo apreciarse el desdoblamiento de ³H anisomicina (purificada electroforéticamente) en ningún otro tipo de sustancia, sin embargo aparecieron unas ciertas cantidades de radioactividad distribuidas de forma inespecífica y que en el caso de solvente 1 llegaron a representar hasta un 10% de contaminación.

La última etapa de la purificación de anisomicina tritiada fué mediante cromatografía en ChromAR Sheet 500 cuyas ventajas sobre otros medios cromatográficos fueron descritos en Métodos (II.2.3).

Se empleó el solvente 1 por ser el que había puesto de manifiesto un mayor porcentaje de impurezas. El desarrollo del cromatograma realizado a temperatura ambiente tenía una duración aproximada de 1,5 horas. Una vez alcanzados

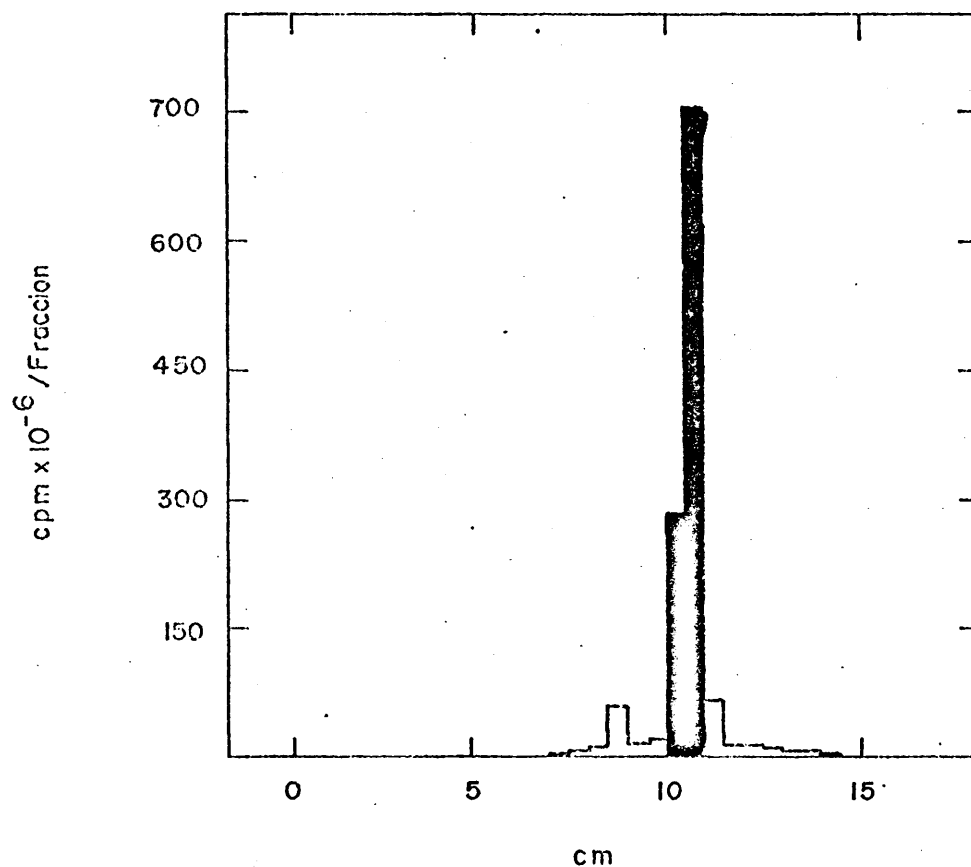


FIG.III.8. Purificación de ³H anisomicina. Material purificado por electroforesis. Cromatografía en ChromAR Sheet 500

Condiciones experimentales: Solvente 1, sec-butanol: bencina de petróleo (40-60°C): amoniaco 2 N (25:5:4).

El desarrollo del cromatograma (ascendente) fué realizado a temperatura ambiente. Fracciones en negro fueron eluidas y consideradas 100% ³H anisomicina (III.1.7)

La detección se realizó mediante luz ultravioleta.

los 16 cms de desarrollo se secó el cromatograma procediéndose a la determinación del perfil de radioactividad (Fig. III.8) según los controles paralelos. La zona a eluir se tomó según observación directa a través de la lampara de luz ultravioleta (II.3.3).

La elución, mediante ácido fórmico 10 mM, tuvo lugar durante toda la noche a 0°C. Con objeto de eliminar interferencias en la determinación de pureza mediante espectroscopía ultravioleta debidas a pequeños componentes del medio cromatográfico arrastrados en la elución, se eluyó paralelamente un trozo de ChromAR Sheet 500 de las mismas dimensiones extraído a su vez de un cromatograma en blanco corrido conjuntamente al que contenía el producto a purificar.

Ambos eluidos fueron liofilizados y redissueltos en ácido clorhídrico diluido de tal manera que la solución de ^3H anisomicina 100% pura (ver apartado siguiente) así obtenida quedará a un pH final de 6. Separada una alícuota destinada a estimaciones de pureza, el resto fué almacenado y conservado a -20°C.

No fué observada ninguna degradación de anisomicina durante las tres etapas de purificación a que fué sometida.

III.1.7. ESTIMACION DE PUREZA DE LA PREPARACION DE ^3H ANISOMICINA

^3H anisomicina preparada según se ha descrito en

los apartados III.1.4 al 6 es 100% pura de acuerdo a los siguientes ensayos:

a) electroforesis de alto voltaje en las siguientes soluciones tampón:

Piridina al 5% - ácido acético pH 6,0

Cacodilato sódico 50 mM -ClH pH 6,5

TRIS 50 mM -ClH pH 8,0

Trietanolamina 50 mM -ClH pH 8,6

Etanolamina 50 mM -ClH pH 10,0 y 10,5

b) Cromatografía en papel Whatman 1 y 3 MM con solventes 1 y en ChromAR Sheet 500 con solventes 2 y 3.

c) Fijación hasta saturación a ribosomas de S.cerevisiae.

d) Espectroscopía ultravioleta en el intervalo 205-320 nm.

Estos dos últimos criterios requieren cierta ampliación; el de fijación está basado en la suposición de que tan solo el antibiótico debe interaccionar con el ribosoma mientras que las posibles impurezas, de hacerlo su afinidad sería despreciable.

Así se escogieron unas condiciones experimentales extremas ($7,5 \times 10^{-6}$ M de ribosomas y 10^{-6} M de ^3H anisomicina) tales que se fijara alrededor de un 75% del antibiótico. Una vez realizada la centrifugación se tomó el sobrenadante, al que se le volvió a añadir la misma cantidad de ribosomas repitiéndose el experimento. En esta segunda fase se utilizó un tubo control que contenía ribosomas

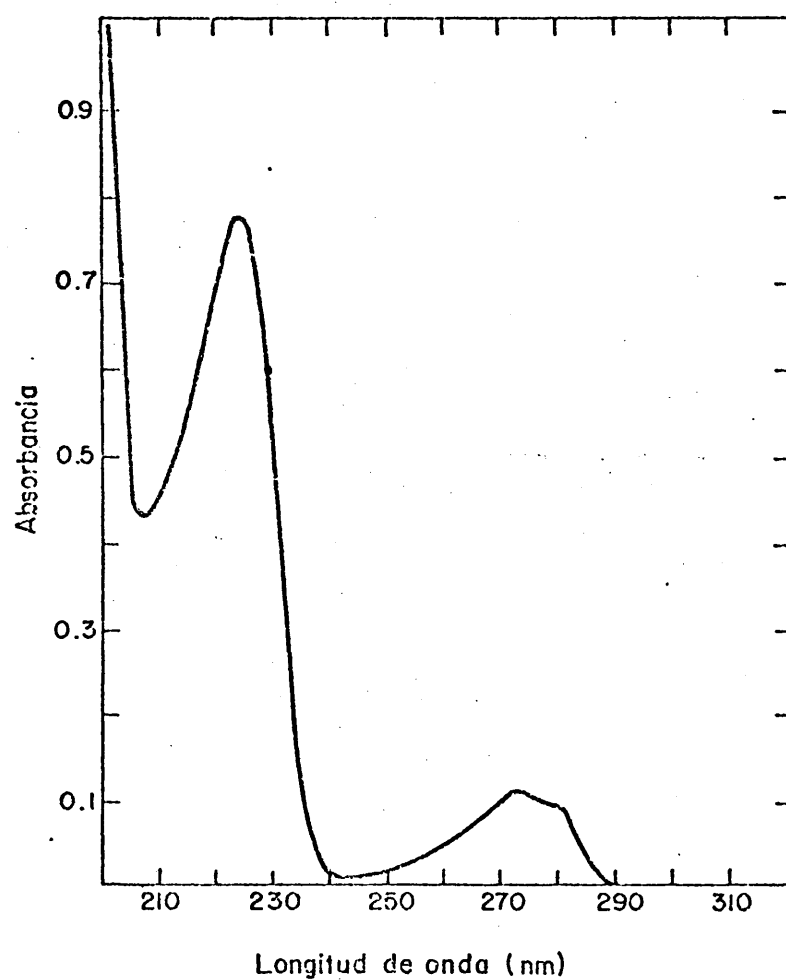


FIG.III.9. Espectro ultravioleta de ³H anisomicina

Determinado en solución acuosa pH 6,0 en un espectrofotómetro Cary 15 de carta móvil en cubetas de cuarzo (U.V. lejano) de 1 cm de paso de luz, frente al blanco de elución del cromatograma.

($7,5 \times 10^{-6}$ M) y una cantidad de la preparación de ^3H anisomicina tal, que su contenido en radioactividad fuese idéntico al del sobrenadante obtenido tras la primera centrifugación.

Si la cantidad de producto fijado en esta segunda parte del experimento es idéntica en ambos tubos será indicación de pureza total según el criterio señalado más arriba. Por ejemplo, suponiendo un 5% de impureza, tras la primera etapa se habría convertido en un 20% que frente al 5% del tubo control de la segunda parte del experimento sería fácilmente detectable. En esta experiencia todos los tubos se hicieron por duplicado.

El criterio definitivo resultó ser la espectroscopía ultravioleta. Identidad total del espectro de absorción (205-320 nm) entre anisomicina no radioactiva y tritiada revela 100% de pureza (Fig. III.9). Pequeñas contaminaciones (2%) debidas a los productos eliminados en la última etapa de purificación provocan elevaciones en los mínimos a 242 y 208 nm (especialmente en este último) perfectamente detectables. En todos los casos el espectro debe realizarse frente al blanco de elución.

La preparación de ^3H anisomicina fué ensayada en su capacidad de inhibir la síntesis de polifenilalanina en un sistema acelular de S.cerevisiae mostrando entera correlación con el antibiótico no marcado (Tabla III.1). Sin embargo la inexactitud de este tipo de experimentos no los hace aptos para estimaciones cuantitativas de pureza.

TABLA III.1

ACTIVIDAD BIOLOGICA DE ^3H ANISOMICINA
SINTESIS DE POLIFENILALANINA

| Sistema | pmoles ^{14}C Fen incorporados | % Inhibición |
|--|--|-----------------|
| Completo | 3,4 | — |
| + Anisomicina 10^{-7} M | 3,0 | 12 |
| + Anisomicina 10^{-6} M | 1,8 | 47 |
| + Anisomicina 10^{-5} M | 0,8 | 75 |
| + Anisomicina 10^{-4} M | 0,2 | 94 |
| + ^3H Anisomicina 10^{-7} M | 3,1 | 10 |
| + ^3H Anisomicina 10^{-6} M | 1,7 | 51 |
| + ^3H Anisomicina 10^{-5} M | 1,0 | 71 |

En un volumen final de 0,1 ml la mezcla de reacción (cond. iónicas BFY) contenía: 0,125 micromoles de GTP, 8 microgramos de poli U, 12 pmoles de ^{14}C Fen-tRNA y 25 pmoles de ribosomas 80S de levadura. Incubación a 30°C durante 30 min. La incorporación de 0,2 pmoles en ausencia de ribosomas ha sido sustraída en todos los casos.

^3H anisomicina así preparada y conservada (siempre a pH ligeramente ácido) permanecía 100% pura transcurrido 1 año desde su obtención.

III.1.8. CALCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ^3H ANISOMICINA.

a) Determinación de la concentración de sus soluciones.

Se empleó la espectroscopía ultravioleta pues anisomicina posee tres máximos de absorción a unas longitudes de onda de 224, 275 y 280 nm cuyos coeficientes de absorción molar son 10.800, 1.800 y 1.600 respectivamente (Index Merck, 1968).

b) Determinación del contenido en radioactividad. - Se determinó en un espectrómetro de centelleo líquido Nuclear-Chicago mod. Mark-II, usando como líquido de centelleo 2,5 ml de Bray's CAB-O-SIL tal y como se describió en el correspondiente apartado de Métodos Analíticos. La eficiencia del espectrómetro fué determinada mediante patrones standard de agua tritiada (New England Nuclear) tratados de idéntica forma que las muestras de ^3H anisomicina. La eficiencia resultó ser del 38% en canal automático de tritio. Blancos conteniendo agua no radioactiva fueron previamente descontados.

El resultado de estas determinaciones fué una actividad específica para ^3H anisomicina de 285 mCi/mmol. A partir de este dato pudo calcularse que el rendimiento de la purificación fué del 2,4 %.

III.2. PREPARACION DE ^3H GOUGEROTINA

III.2.1. PROCESO DE MARCAJE

Se realizó tal y como se ha descrito en II.1.1 para la obtención de ^3H anisomicina. En este caso la cantidad de antibiótico enviada al Radiochemical Centre fué de 25 mg. El resto de las condiciones fueron: 50 mg de catalizador de Adams reducido y 250 Ci de agua tritiada que junto con el antibiótico fueron calentados a 90°C durante 16 horas en una ampolla cerrada al vacío. La eliminación del agua tritiada y del catalizador tal y como se ha descrito. El producto final disuelto en 25 ml de agua destilada contenía 75 mCi (crudo radioactivo).

III.2.2 DETECCION DE ^3H GOUGEROTINA EN EL CRUDO RADIOACTIVO

El sistema empleado fué la inhibición de la síntesis de polifenilalanina en un sistema acelular de *S.cerevisiae*. Los resultados aparecen representados en la figura III.10 de donde se puede concluir que un 15-20% del crudo radioactivo es ^3H gougerotina, suponiendo que todo el poder inhibidor en él contenido sea debido al antibiótico tritiado.

A pesar de la poca fiabilidad de este tipo de determinaciones la escasez de producto tritiado fué razón suficiente para darlo por bueno si bien hubo de ser tomado con muchas reservas en su apreciación cuantitativa.

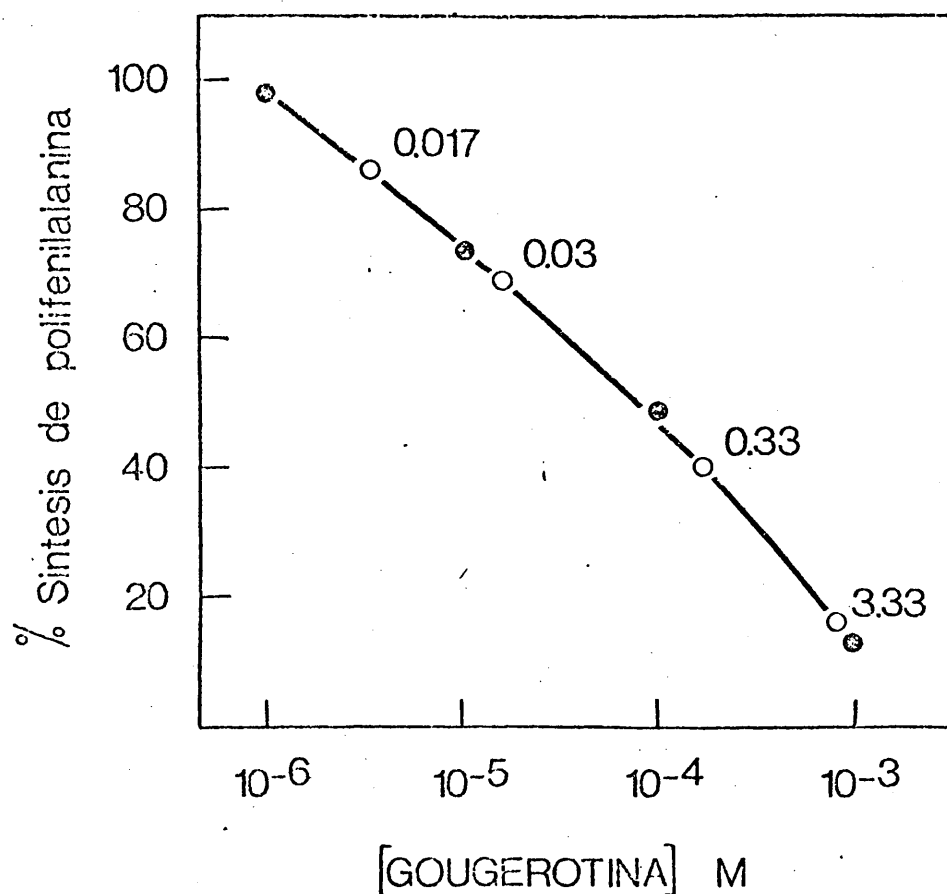


FIG.III.10. Determinación del contenido de ^3H gougerotina en el crudo radioactivo. Ensayo de síntesis de polifenilalanina (*S.cerevisiae*).

Condiciones del ensayo según II.3.7. Los círculos blancos (o) son interpolaciones de cantidades conocidas de crudo. Los números adyacentes expresan el factor de concentración (1 equivale a 1 mg/ml de gougerotina original) ●—● Curva patrón.

III.2.3. ESTUDIOS DE LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA DE GOUGEROTINA

La experiencia adquirida en la purificación de ^3H anisomicina determinó la línea de trabajo a seguir en la purificación de ^3H gougerotina.

Así el primer paso consistió en estudiar la resolución del crudo radioactivo en las distintas condiciones de pH que afectan la movilidad electroforética de gougerotina. Dado que este antibiótico posee dos grupos ionizables de pK_{a} s 3,6 y 8,0 (Fox y cols. 1964) son varias las situaciones que pueden darse:

- pH 2,0: Carga máxima, ambos grupos amino completamente ionizados. Tampón: ácido fórmico (2% v/v) ácido acético (7,5% v/v). Condiciones experimentales 70 V/cm durante 30 minutos. Movilidad $2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}.\text{seg}$
- pH 2,8: Teóricamente carga máxima, pero en la zona en la que debe comenzar a verse afectado el menos básico de los grupos amino. Tampón: ácido fórmico (1% v/v)-amoniac. Condiciones experimentales: 70 V/cm durante 30 minutos. Movilidad $1,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}.\text{seg}$
- pH 3,7: Carga entre 1 y 2 (zona del $\text{pK}_{\text{a}1}$). Tampón: ácido fórmico 50 mM-amoniaco. Condiciones experimentales: 70 V/cm durante 50 minutos. Movilidad: $1,3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}.\text{seg}$.
- pH 6,0: Solamente el segundo grupo iónico (pK_{a} 8) estará

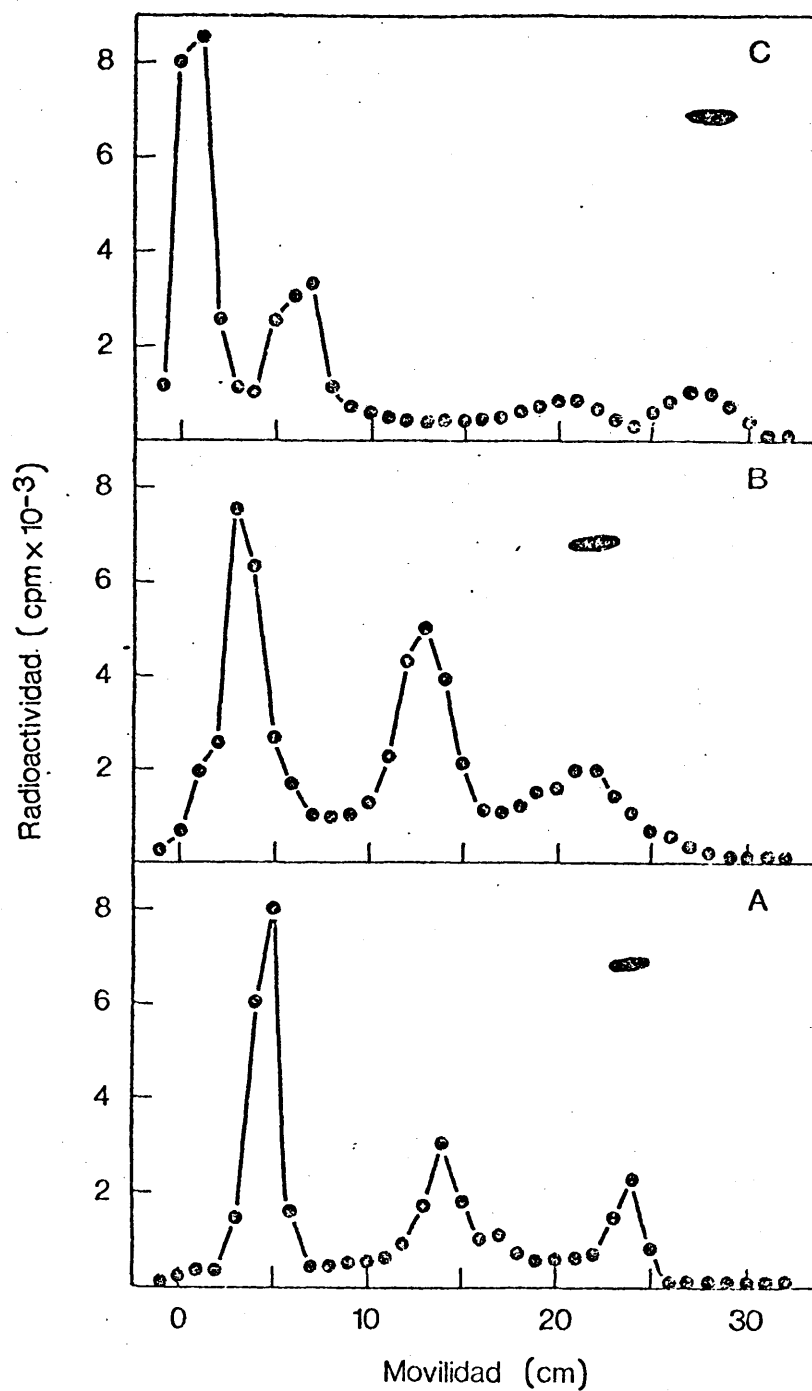


FIG.III.11. Comportamiento electroforético de gougerotina (manchas negras) y su correspondiente crudo radioactivo.

A. pH 2,0; B. pH 2,8; C. pH 3,7.

Otras condiciones experimentales ver III.2.3.

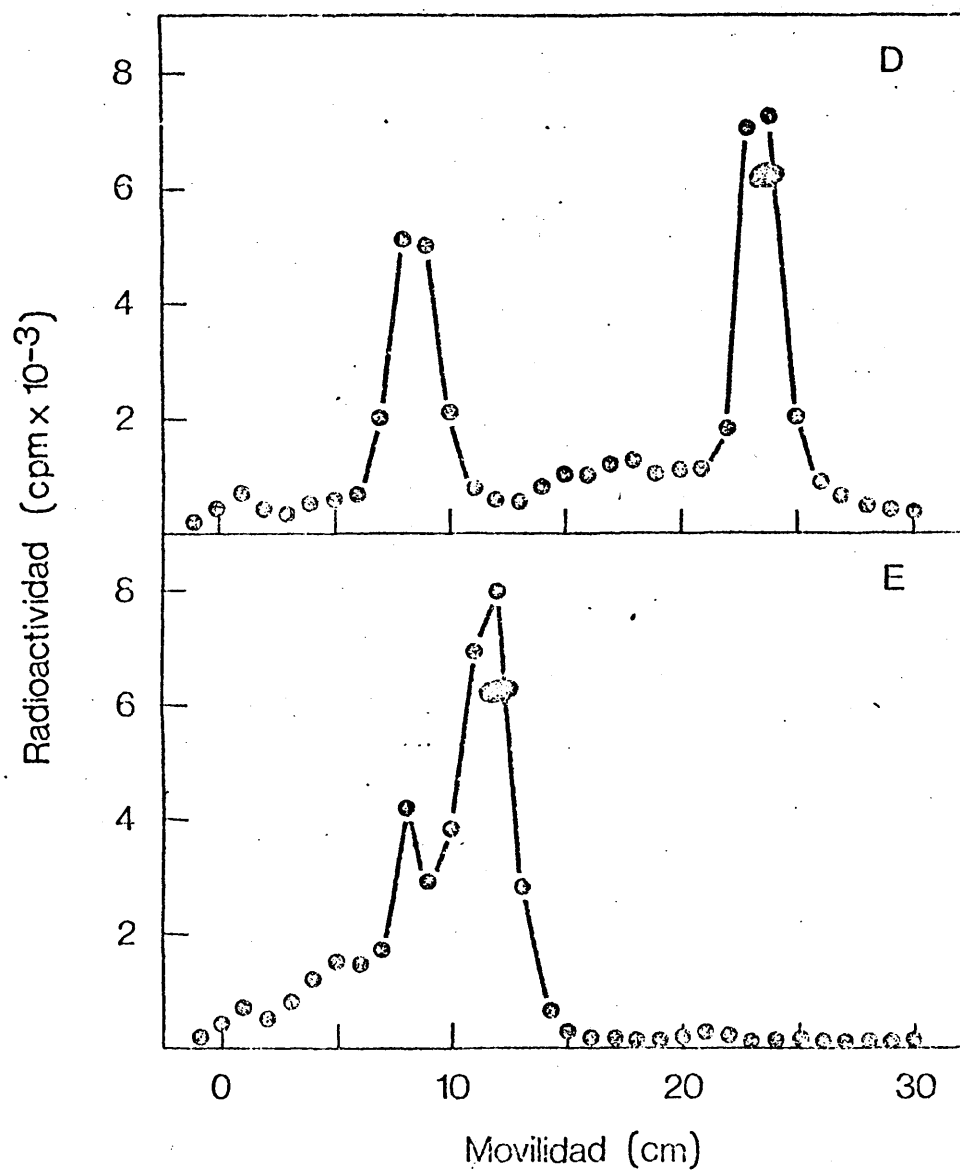


FIG.III.12. Comportamiento electroforético de gougerotina (manchas negras) y su correspondiente crudo radioactivo (continuación).

D. pH 6,0 ; E. pH 10,0

Otras condiciones experimentales ver III.2.3.

ionizado. Tampón: piridina (1,75% v/v)-ácido acético (0,25% v/v). Condiciones experimentales: 70 V/cm durante 60 minutos. Movilidad $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V} \cdot \text{seg.}$

pH 10,0: La carga iónica debe ser mínima. Tampón: Trietanolamina 50mM-ClH. Condiciones experimentales: 105 V/cm durante 80 minutos. Movilidad: $0,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V} \cdot \text{seg.}$

En todos los ensayos ha sido empleado papel Whatman 1. La aplicación de crudo radioactivo fué de 2×10^{-3} ml. Los perfiles de radioactividad obtenidos en estas condiciones aparecen en las figuras III.11 y 12. Las conclusiones que pueden deducirse de estos experimentos son:

a) El grupo amino de pK_a 8 no aporta ninguna contribución provechosa a la resolución del crudo radioactivo (Fig. III.12). A diferencia de lo establecido para ^3H anisomicina, cuanto menor es la carga iónica, la movilidad de los componentes del crudo va tomando valores cada vez mas próximos.

b) A pesar del valor del pK_a 3,6, la movilidad de gougierotina comienza a ser afectada a pHs netamente inferiores (pH 2,8). Hay que tener presente que la concentración de los electrolitos no es constante para todas las soluciones tampón por lo que los valores de las movilidades han de ser tomados tan solo a título indicativo.

c) La figura III.11 aparece indicativa de un fenómeno

similar al obtenido con anisomicina (III.1.3). Es decir a medida que se ve afectada la carga iónica del grupo amino mas ácido, el máximo de radioactividad se resuelve en dos picos.

Sirva este ejemplo para llamar la atención acerca de verdaderas o falsas "resoluciones" que en todo momento deben ser comprobadas. Figura III.13 pone de manifiesto, al aislar los productos de máxima movilidad a pH 2,0 y correrlos a pH 3,7 (parte A) que el pico de movilidad ligeramente inferior a gougerotina en estas condiciones no procede de una resolución del máximo a pH 2,0. Así con este grupo iónico sucede exactamente igual que con el de $pK_a 8$, es decir, pérdida de carga iónica implica pérdida de resolución.

En la parte B de la figura III.13, donde se han vuelto a correr a pH 2,0, aparecen muy claros los fenómenos de arrastre o interferencias entre máximos de radioactividad (apuntados en la sección III.1) siendo elevada la contaminación debida al pico de movilidad intermedia.

Puede concluirse finalmente que el paso inicial ha de ser una columna cambiada de cationes, debiendo hacerse la cromatografía a un pH lo mas bajo posible.

III.2.4. ETAPAS DE PURIFICACION.

COLUMNA DE INTERCAMBIO IONICO.

Según los requerimientos apuntados en el apartado anterior fué necesario utilizar una columna de fosfo-celulosa

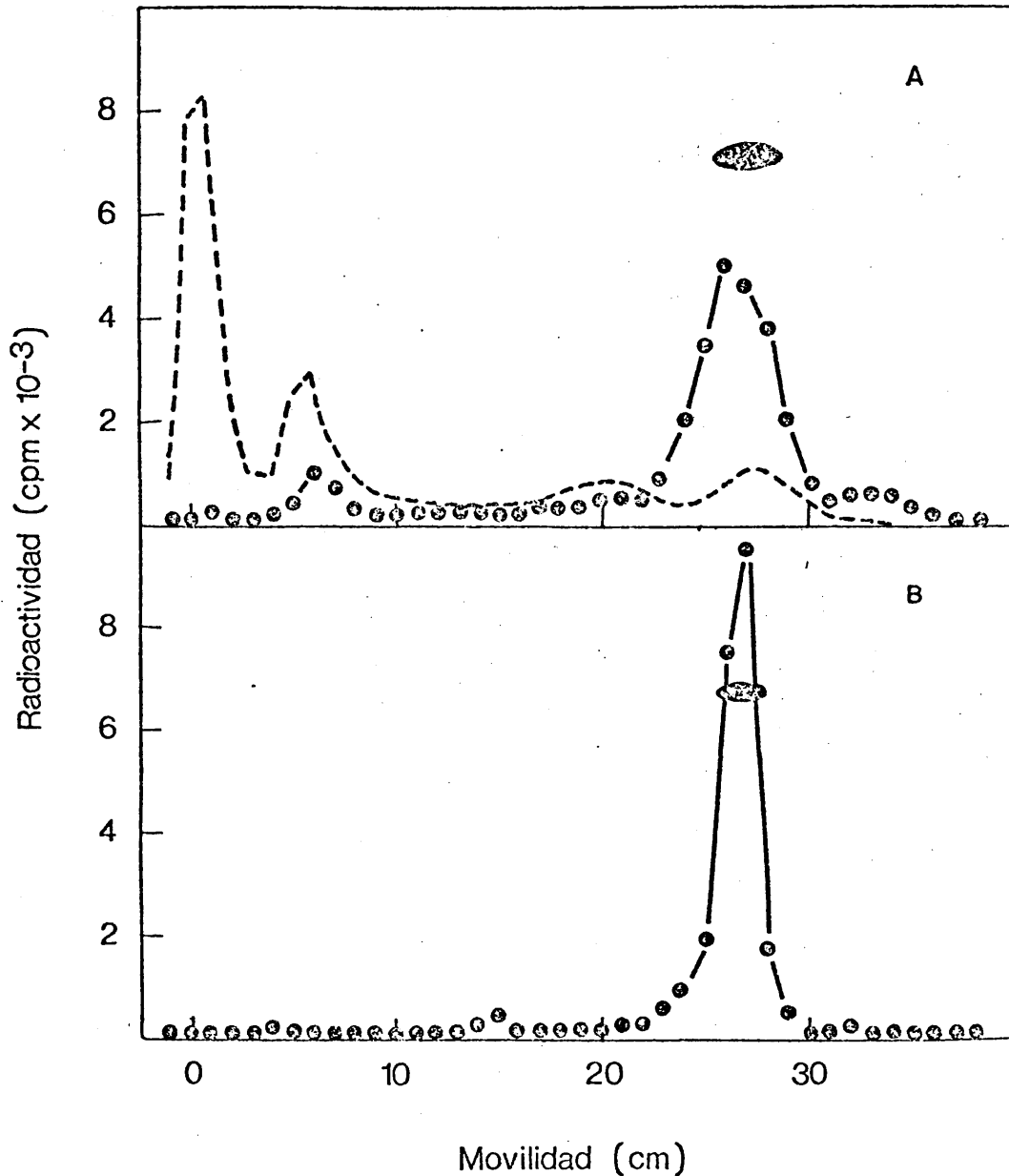


FIG.III.13. Comportamiento electroforético de ³H gouge-
rotina (crudo radioactivo) purificada en electroforesis a pH 2,0

A. pH 3,7 La línea discontinua representa, como
referencia, el perfil de radioactividad del crudo
radioactivo sin purificar

B. pH 2,0

Condiciones experimentales ver texto.

cuya preparación fué llevada a cabo tal y como se describió en Métodos. A lo largo del presente apartado debe tenerse en cuenta que todas las concentraciones de las soluciones tampón empleadas vienen dadas en el ion eluyente, amonio. La cantidad de ácido fórmico será la necesaria para llevar el tampón a pH 2,8. Ha sido utilizado este pH debido a las características técnicas de la P-celulosa, ya que a valores inferiores la resina se encuentra en forma protonada.

7,5 ml de crudo radioactivo previamente liofilizados y redissueltos en 2 ml de solución tampón inicial: ácido fórmico-amoniaco (0,15 M) pH 2.8, fueron aplicados a la columna siendo lavados con 150 ml de dicho tampón para eliminar la radioactividad no fijada (65%).

La elución de ^3H gougérotina se llevó a cabo mediante 300 ml de un gradiente lineal de la misma solución tampón de concentración límites 0,15 y 1,5 M en ion amonio. Finalmente y con objeto de lavar la columna se pasaron 150 ml de una concentración 2,5 M.

La velocidad de elución fué 60 ml/hora. Dado el mayor empaquetamiento de la P-celulosa fué necesario introducir una ligera presión mediante una bomba peristáltica. Cada una de las fracciones recogidas contenía 10 ml.

El perfil de radioactividad (Fig. III.14) muestra un máximo contenido en 2-3 fracciones que eluye a 0,85 M de ion amonio precedido por un "hombro" de radioactividad

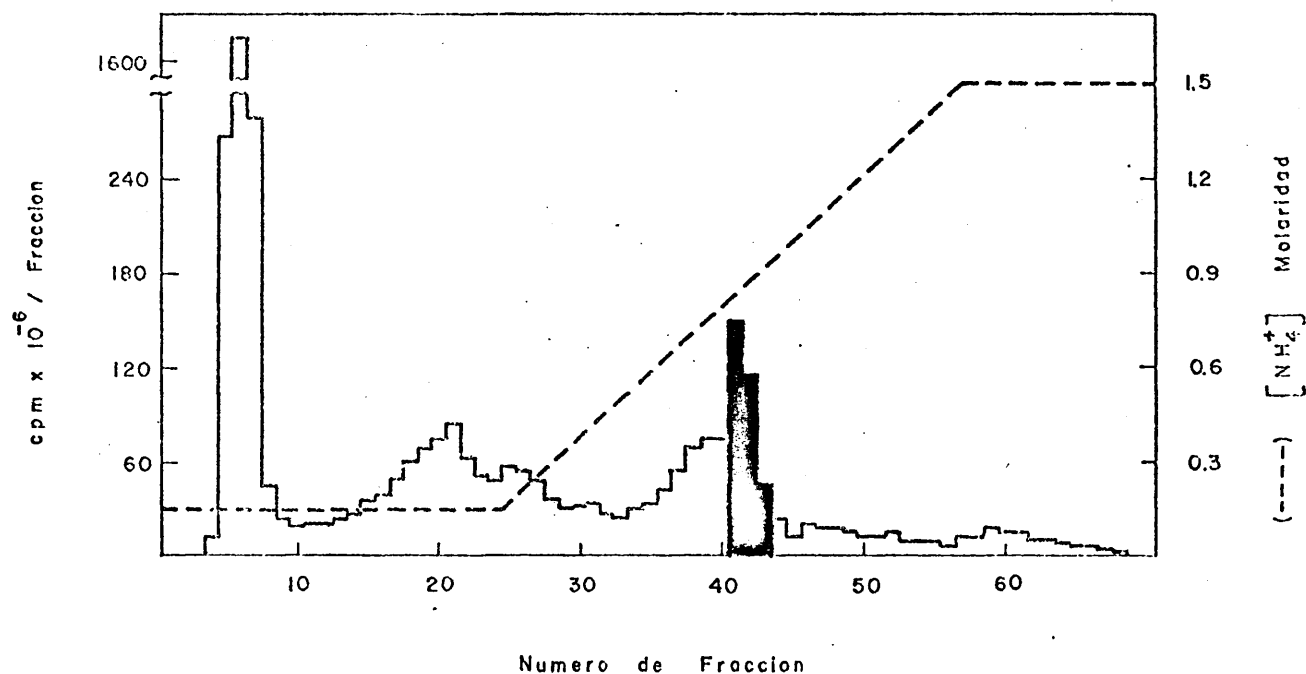


FIG.III.14. Purificación de ³Hgougerotina. Cromatografía en columna sobre P-celulosa.

Aplicación : 7,5 ml de crudo radioactivo equivalentes a 7,5 mg de gougerotina original.

Elución : 0-4°C, mediante las concentraciones expresadas de ión amonio.

Fracciones en negro fueron tomadas para proseguir el proceso de purificación.

(así mismo 2-3 fracciones). Esta situación permaneció constante a lo largo de las cromatografías efectuadas comprobándose en la realizada previamente, con objeto de determinar las condiciones idoneas de elución (ver apartado correspondiente en purificación de ^3H anisomicina), que gougerotina eluía coincidiendo con el máximo de radioactividad.

No obstante, las fracciones eluidas en este area fueron analizadas mediante electroforesis de alto voltaje en las condiciones descritas para pH 2,0 excepto que el tiempo de corrida fué 40 minutos. Figura III.15 muestra que en ambos casos existe una impureza correspondiente al pico de radioactividad intermedio, sin embargo en aquellas fracciones del "hombro" (38-40) el grado de contaminación respecto al máximo de movilidad 30 cms, es superior al 50%, lo que unido a los resultados obtenidos con la cromatografía analítica en columna hizo que se desecharan tales fracciones tomándose tan solo 41-43 (en negro en la figura) para las siguientes etapas de purificación.

A lo largo de estos resultados parecía obvio que la siguiente etapa de purificación fuera electroforesis de alto voltaje a pH 2,0. Esta se llevó a cabo en forma semipreparativa. En previsión de que sucedería como en la purificación de anisomicina tritiada donde fué necesaria una posterior etapa cromatográfica para eliminar los últimos restos de contaminación, se desarrollaron simultaneamente una serie de solventes cromatográficos (6). Estos pusieron de manifiesto porcentajes del 10 al 20% de impurezas cuando

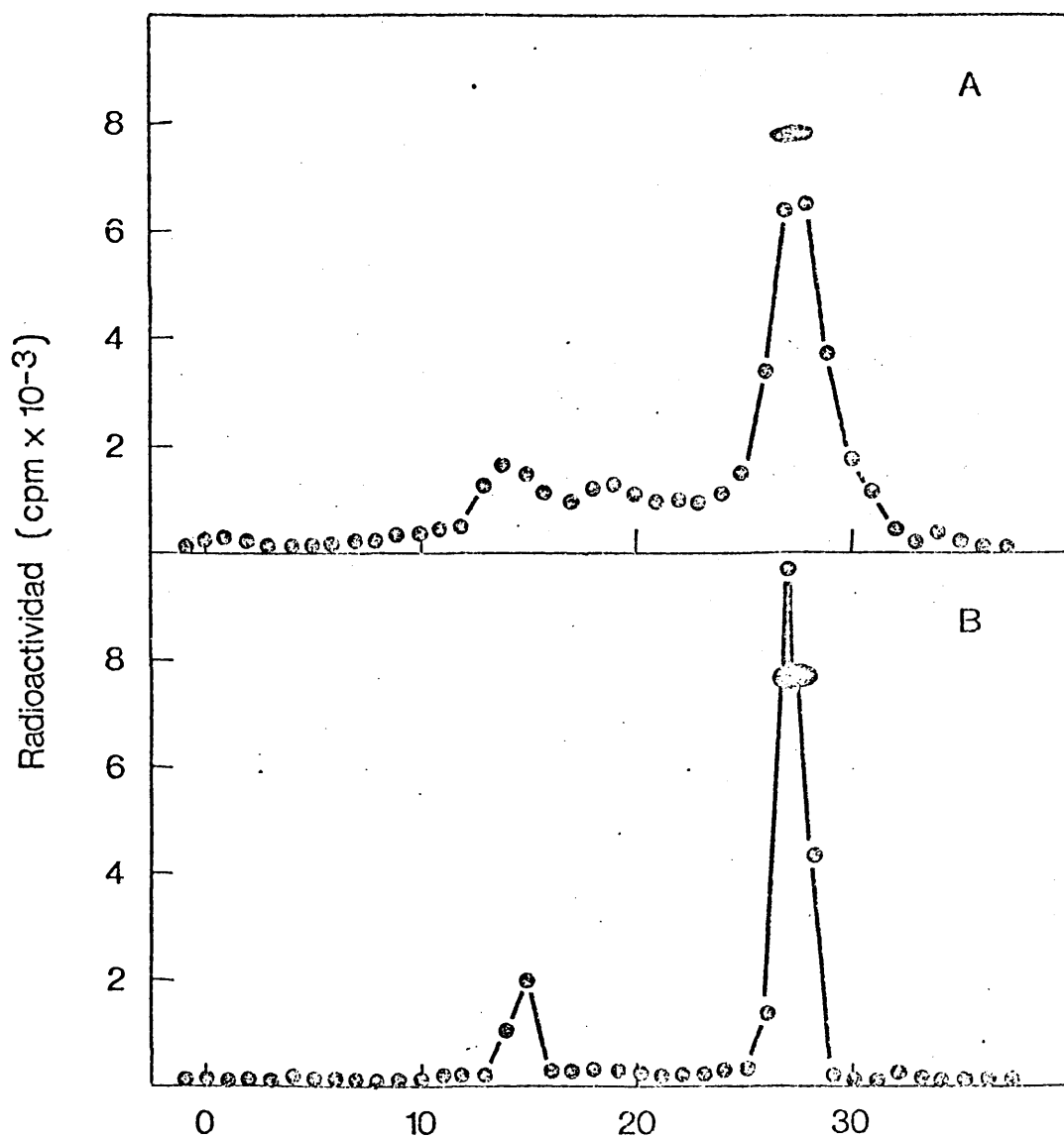


FIG.III.15. Análisis electroforético (pH 2,0) de las fracciones eluidas de la columna de P-celulosa.

A. Fracciones 38-40

B. Fracciones 41-43 (en negro, figura III.14)

Ac.fórmico (2%)-ac.acético (7,5%). 70 V/cm, 1/2 hr.

se ensayó la preparación de ^3H gougertina procedente de la purificación por columna y electroforesis de alto voltaje.

Considerando que la purificación total iba a necesitar tres etapas se trató, mediante experiencias semicuantitativas, acoplar los solventes cromatográficos en forma secuencial escogidos entre los que mostraran mayor porcentaje de impurezas. Esto implicaba el cambio de una electroforesis por una cromatografía cuyas ventajas en cuanto a identificación y aislamiento del producto a purificar han sido puestas de manifiesto repetidas veces a lo largo de esta Tesis.

III.2.5. ETAPAS DE PURIFICACION.

CRÓMATOGRAFIA EN ACIDO SILICICO-FIBRA DE VIDRIO.

Todos los ensayos cromatográficos realizados durante la purificación de ^3H gougertina lo fueron sobre ChromAR Sheet 500. Los solventes fueron:

solvente I : terc-butanol-metiletilcetona-agua-amoniaco (4:3:2:1) $R_F = 0,40$.

solvente II : Amoniaco-n-butanol-n-propanol-etanol-agua (9:8:8:2:2) $R_F = 0,54$.

solvente III : n-butanol-ácido fórmico-n-propanol-ácido tricloracético-agua-acetona (10:5:5:4:4:2) $R_F = 0,66$.

solvente IV : Metanol-isopropanol-amoniaco-agua (9:6:3:2) $R_F = 0,72$.

Solvente V: Agua-n-propanol-amoniaco (90:10:1) $R_F = 0,72$.

Solvente VI: Acetonitrilo-acetato amónico 01 M (7:3) $R_F = 0,28$.

Estos solventes fueron tomados, con ligeras modificaciones, de sistemas descritos para la separación de nucleósidos, especialmente citidina y deoxicitidina (Zweig y Whitaker, 1971).

Se hicieron purificaciones semipreparativas con las siguientes parejas de solventes: I-VI (2%), I-V (4%) y IV-VI (0%). Los números entre paréntesis representan los porcentajes máximos de contaminación detectados mediante cromatografías analíticas en los 4 solventes restantes.

Tras estos resultados se procedió a la purificación final de ^3H gougerotina, mediante 2 cromatografías sucesivas. La primera en el solvente IV, cuyo resultado, deducido de los controles laterales de radioactividad aparece en la figura III.16. La zona marcada en negro fué eluida a 4°C con agua destilada durante toda la noche. El eluido, tras ser liofilizado y rediseuelto en una cantidad mínima de agua fué repurificado mediante una segunda cromatografía en el solvente VI. Las zonas representadas en negro en la figura III.17 fueron eluidas y consideradas como ^3H gougerotina 100% pura de acuerdo a los criterios expuestos en el apartado siguiente.

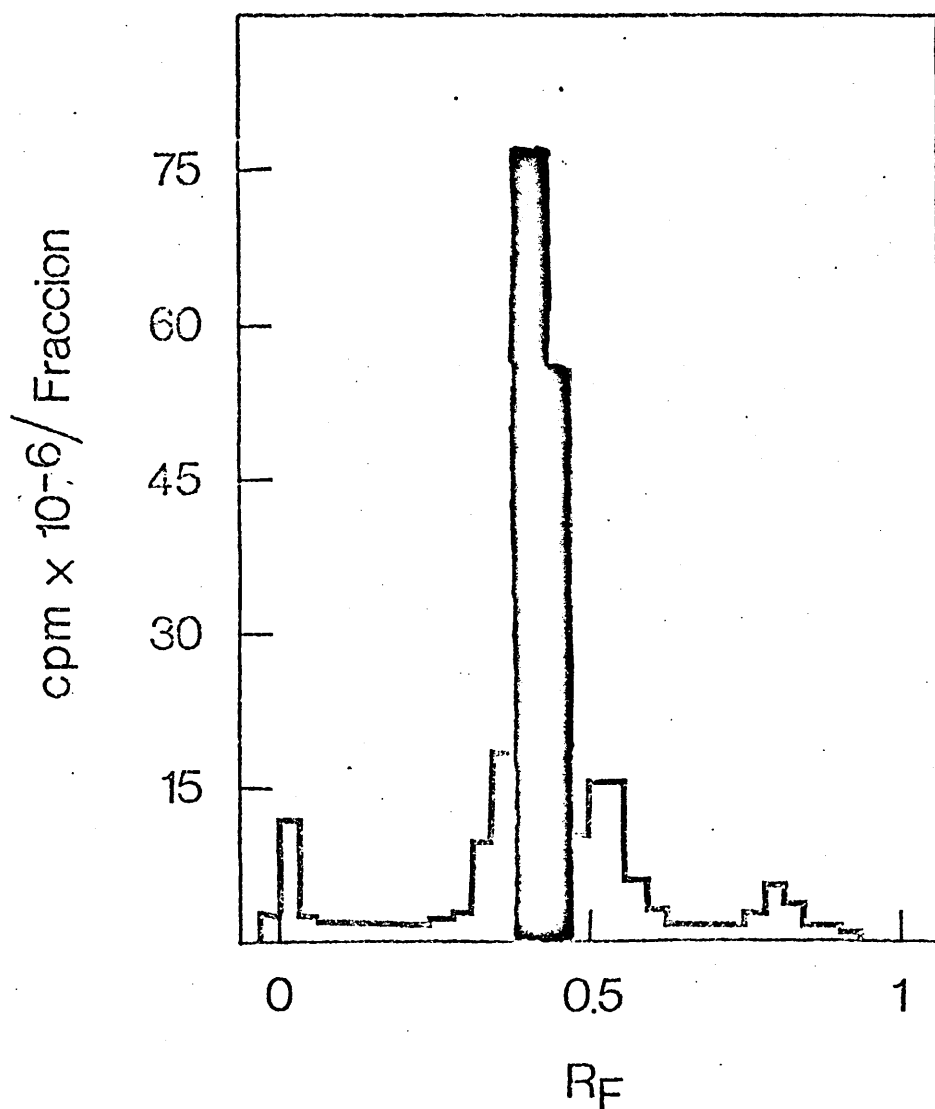


FIG. III. 16. Purificación de ^3H gougierotina. Cromatografía en ChromAR Sheet 500 (Solvente IV).

Aplicación : Material eluido en las fracciones 41-43 de la columna de P-celulosa,

Desarrollo : Ascendente. Temperatura ambiente

Identificación: Directo (luz ultravioleta)

Fracciones en negro fueron eluidas para posterior purificación.

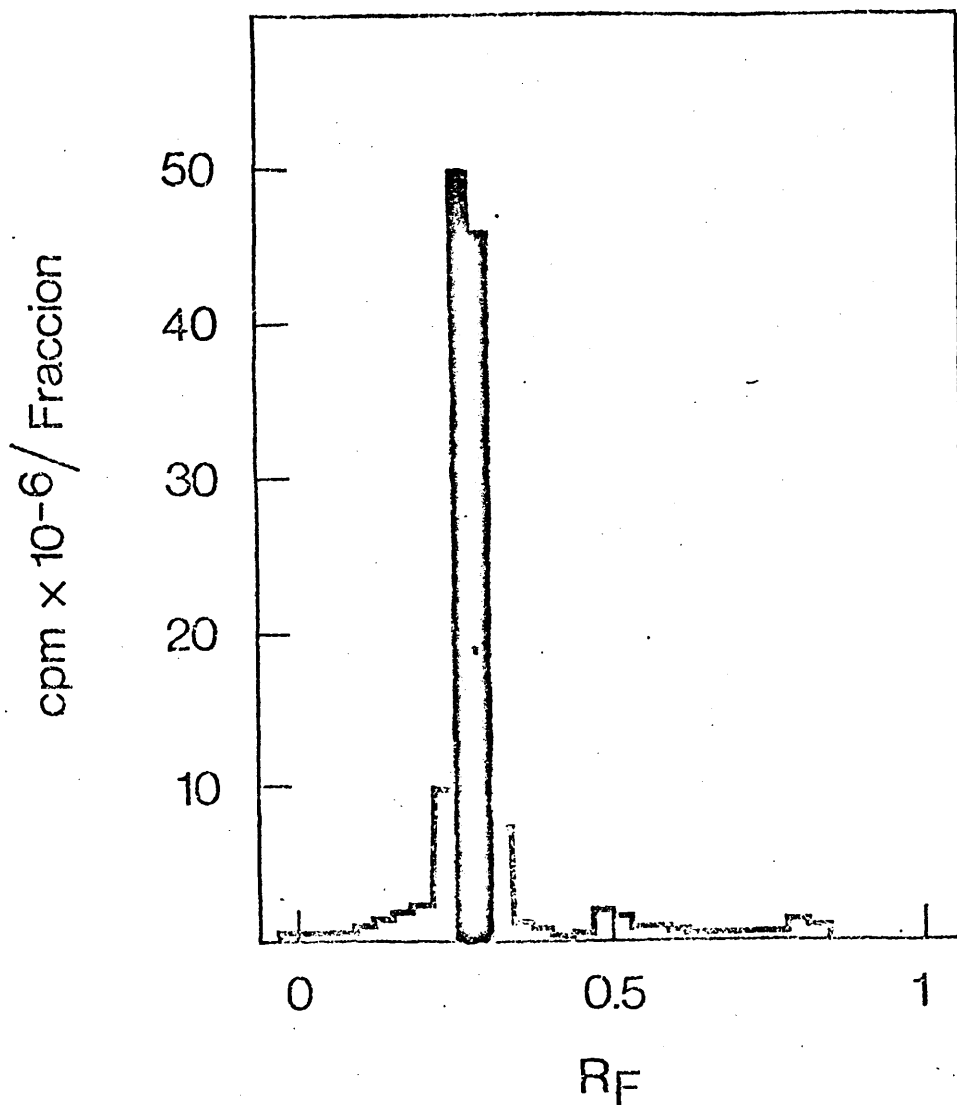


FIG.III.17. Purificación de ^3H gougierotina. Cromatografía en ChromAR Sheet 500 (Solvente VI).

Aplicación : eluido según Figura III.16.

Desarrollo e identificación: como en Figura III.16

Fracciones en negro fueron consideradas ^3H gougierotina 100% pura (III.1.6).

III.1.6. ESTIMACION DE PUREZA DE LA PREPARACION DE ^3H GOUGEROTINA

La preparación de ^3H gougerotina obtenida a partir de su correspondiente "crudo radioactivo" según se ha descrito en los apartados anteriores fué considerada como 100% pura de acuerdo a:

a) Electroforesis de alto voltaje. - 1) pH 2,0. Tampón de ácido fórmico (2% v/v) y ácido acético (7,5% v/v) y una diferencia de potencial de 70 V/cm durante 40 minutos. 2) pH 3,7. Tampón ácido fórmico 50 mM-amoniaco, voltaje 70 V/cm y tiempo 50 minutos. 3) pH 6,0. Tampón piridina (1,75% v/v)-ácido acético (0,25% v/v), voltaje 70 V/cm y tiempo 1 hora.

b) Cromatografía en ChromAR Sheet 500. - Se emplearon los solventes I, II, III y V.

c) Fijación hasta saturación a ribosomas de *S. cerevisiae*. - Tal y como se describió en la estimación de pureza de ^3H anisomicina. En este caso las condiciones empleadas fueron 6×10^{-6} M de ribosomas y $0,75 \times 10^{-6}$ M de ^3H gougerotina.

d) Espectroscopía ultravioleta. - En el rango 200-320 nm. También en este caso resultó ser el criterio mas conclusivo y por partida doble puesto que gougerotina presenta dos espectros de absorción distintos, dependiendo del pH a que se encuentre (neutro ó ácido). En ambas circunstancias se encontró total identidad entre gougerotina normal

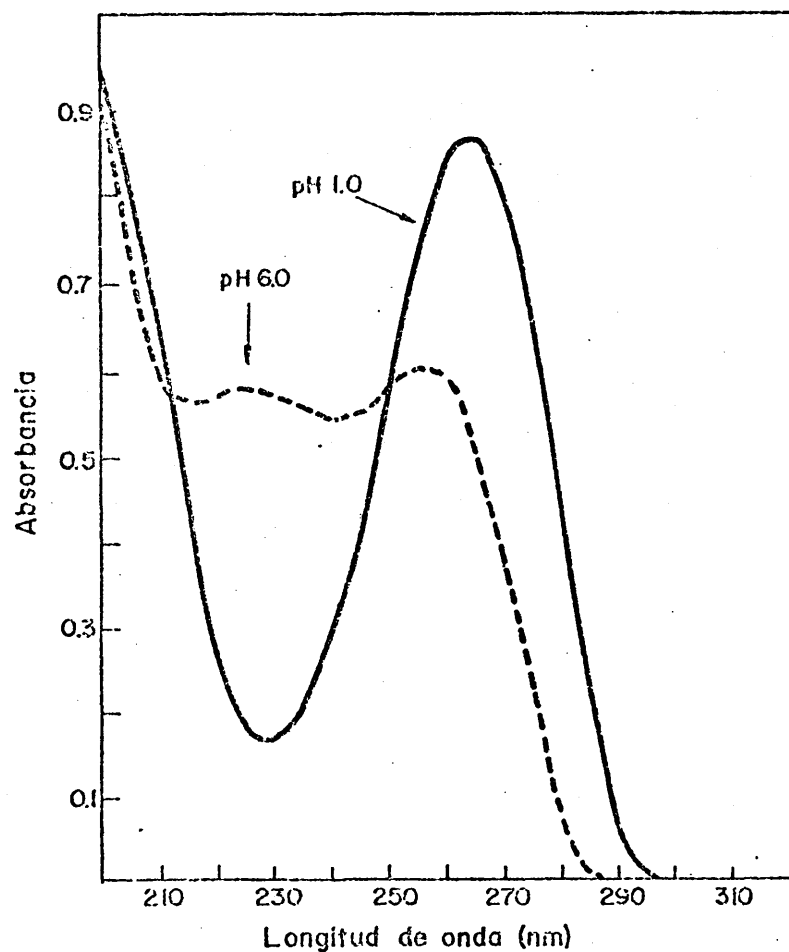


FIG.III.18. Espectro ultravioleta de ^3H gougertina

— pH 1,0 en ácido clorhídrico 0,1 M

--- pH 6,0 en solución acuosa.

Ambos espectros son idénticos a los de gougertina no radioactiva. Fueron determinados en un espectrofotómetro Cary 15 frente al blanco de elución del cromatograma.

y tritiada (Fig. III.18). Pequeñas contaminaciones (2-5 %) producen elevaciones del mínimo a 228 nm en solución acuosa así como en el existente a 240 nm en solución 0,1 N de ácido clorhídrico, si bien en este caso la sensibilidad es inferior. Los espectros han sido siempre realizados frente al blanco de elución (ver correspondiente apartado II.3.4).

Esta preparación de ^3H gougerotina fué ensayada en su capacidad de inhibir la síntesis de polifenilalanina en un sistema acelular de S.cerevisiae mostrando, según se indica en la Tabla III.2, entera correlación con el antibiótico no marcado.

Las soluciones de ^3H gougerotina fueron almacenadas a -20°C comprobándose a los 10 meses de su obtención unas degradaciones del 10% detectables, en mayor o menor grado en todos los solventes descritos.

Posterior purificación en solvente VI condujo a una preparación 100% pura por todos los criterios aquí descritos (criterio C no fué empleado). En esta ocasión se conservó en nitrógeno líquido no pudiendo ser apreciada ninguna degradación 50 días después de esta repurificación.

III.1.7. CALCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA

a) Determinación de la concentración de las soluciones de ^3H gougerotina. - Se realizó mediante espectroscopía ultravioleta en las dos condiciones descritas en el apartado anterior obteniendo idénticos resultados (lo que es una prueba

TABLA III.2

ACTIVIDAD BIOLOGICA DE ^3H GOUGEROTINA
SINTESIS DE POLIFENILALANINA

| Sistema | pmoles ^{14}C Fen incorporados | % Inhibición |
|--|--|-----------------|
| Completo | 3,8 | — |
| + Gougerotina 10^{-6} M | 2,1 | 46 |
| + Gougerotina 10^{-5} M | 3,1 | 19 |
| + Gougerotina 10^{-4} M | 3,6 | 3 |
| + ^3H Gougerotina 10^{-6} M | 2,0 | 48 |
| + ^3H Gougerotina 10^{-5} M | 3,1 | 19 |
| + ^3H Gougerotina 10^{-4} M | 3,7 | 1 |

En un volumen final de 0,1 ml la mezcla de reacción (BFY) contenía: 0,125 micromoles de GTP, 8 microgramos de poli U, 12 pmoles de ^{14}C Fen-tRNA y 25 pmoles de ribosomas 80S de levadura. Incubación a 30°C durante 30 minutos. El blanco (0,2 pmoles) fué sustraído en todos los casos.

mas de pureza).

Los coeficientes de extinción molar que sirvieron de base para estas determinaciones fueron (Fox y cols. 1964) en solución acuosa, máximo a 266 nm ($E = 9.400$) y a 234 nm ($E = 8.900$); solución 0,1 N en ácido clorhídrico, único máximo a 276 nm ($E = 13.300$).

b) Determinación del contenido en radioactividad. Tal y como se describió para ^3H anisomicina (III.1.8).

El resultado final (tras la repurificación en solvente VI) fué una actividad específica para ^3H gougerotina de 80 mCi/mmol, siendo el rendimiento final de la purificación del 1,6%.

III.3. OBTENCION DE ^{14}C TRICODERMINA

III.3.1. SINTESIS DE ^{14}C TRICODERMINA

^{14}C Tricodermina se ha obtenido mediante una simple reacción química de acetilación del alcohol tricodermol (ver Introducción) según método descrito por Godfredsen y Vangedal (1965) al que se han introducido las modificaciones necesarias a la escala micropreparativa en que se ha realizado esta síntesis. La reacción es:



El anhídrido acético isotopicamente marcado (sin disolvente) se obtuvo de New England Nuclear Co. La actividad específica era según la casa comercial de 33 mCi/mmol (ver apartado III.3.3). La cantidad requerida fué 1 mCi (30,3 micromoles) lo que equivalía aproximadamente a 3×10^{-3} ml. Dada la inmanejabilidad de esta solución se centrifugó suavemente la ampolla que lo contenía a fin de que todo el anhídrido acético quedase en el fondo, de tal forma que la reacción tuviera lugar directamente en este recipiente. A el se añadieron 250 mg de tricodermol (en forma sólida) equivalentes a 50 micromoles y 0,03 ml de piridina, solvente en el que habría de ocurrir la acetilación. Previamente se comprobó por espectroscopía infrarroja que la preparación de tricodermol estaba libre de tricodermina (enlaces ester).

El exceso de tricodermol se debió a un intento de

mejorar el rendimiento de la síntesis, considerando que su posterior separación de ^{14}C tricodermina habría de conseguirse sin ningún problema (ver apartado siguiente).

La ampolla fué cerrada hermeticamente y tras agitar fuertemente la mezcla se incubó a 30°C durante 22 horas. Transcurrido este tiempo y previo secado a vacío de la ampolla se procedió al aislamiento de ^{14}C tricodermina.

III.3.2. AISLAMIENTO DE ^{14}C TRICODERMINA

Con anterioridad se había desarrollado un sistema cromatográfico capaz de separar tricodermina de tricodermol. Las condiciones experimentales fueron soporte cromatográfico ChromAR Sheet 500. Solvente, benceno-acetato de etilo-pentano (4:1:1) (el resto tal y como se describió en Métodos). Los R_F fueron 0,26 para tricodermol y 0,61 para tricodermina.

El antibiótico radioactivo fué eluido con etanol durante toda la noche de la zona del cromatograma señalada por los controles paralelos de tricodermina no radioactiva. Se comprobó que su pureza era del 100% mediante ensayos cromatográficos en el mismo solvente de purificación y en isooctanol - n-butanol (5:1) (Fig. III.19). Dada la estructura del antibiótico no fué posible aplicar la técnica de electroforesis ni de espectroscopía ultravioleta.

Hay que considerar que esta purificación presentaba unas características completamente distintas a ^3H anisomi-

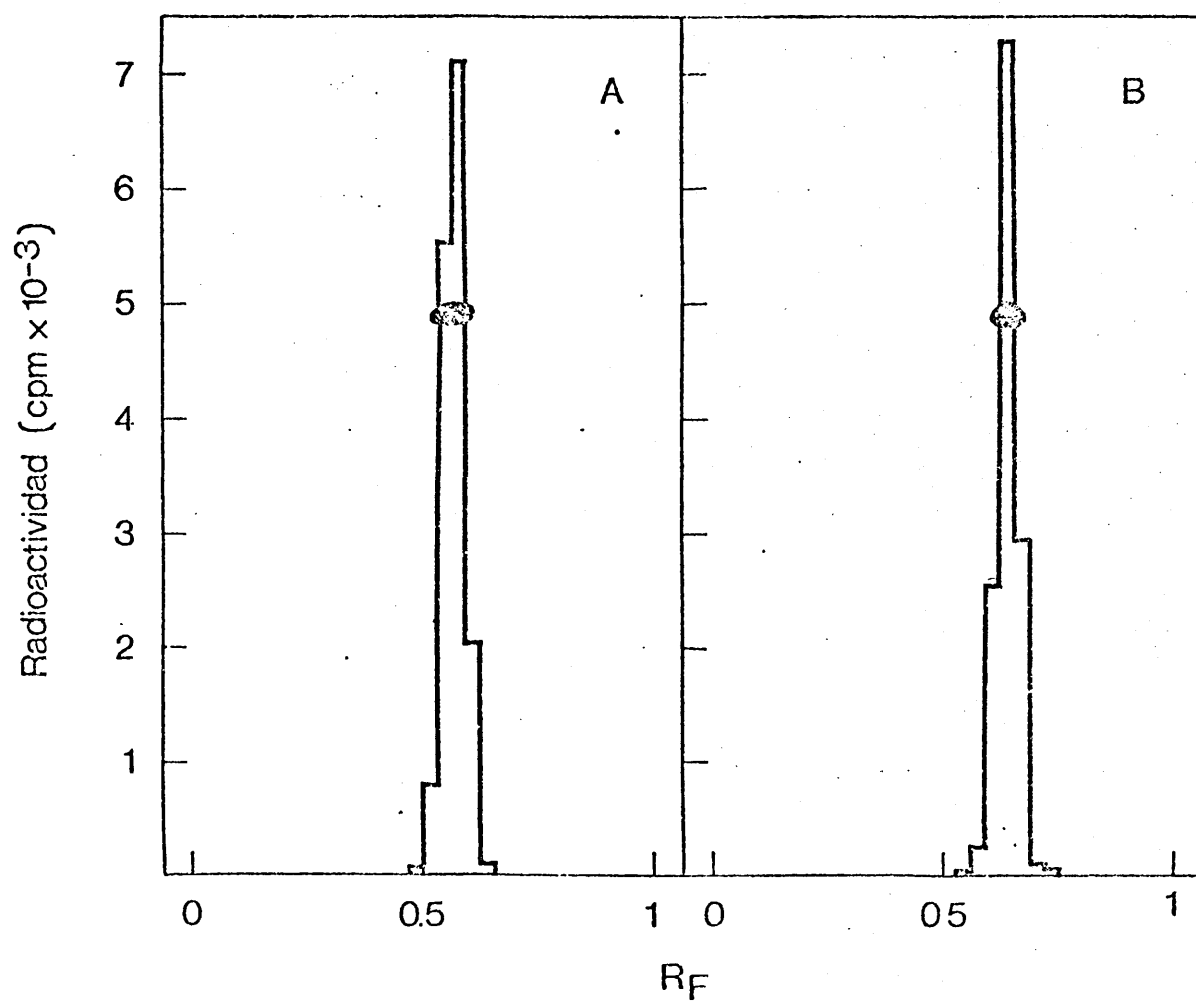


FIG.III.19. Pureza de la preparación de ^{14}C tricodermina

- A. Cromatografía en ChromAR Sheet 500.
Solvente benceno:acetato de etilo: pentano (4:1:1).
- B. Idem. Solvente isooctano:n-butanol (5:1).

cina ó ^3H gougerotina. Allí se trataba de impurezas mayoritarias y desconocidas, muchas de ellas de estructura casi idéntica al producto a purificar, amen de un gran contenido inespecífico de radioactividad. En este caso tan solo 4 eran los componentes de la reacción: ^{14}C tricodermina, tricodermol ^{14}C anhídrido acético que no hubieran reaccionado y ^{14}C ácido acético procedente de la hidrólisis de su anhídrido. Controles previos mostrando que ninguno de estos últimos corrían cromatográficamente con el primero eran ya de buena garantía de la pureza conseguida en la obtención de ^{14}C tricodermina.

III.3.3. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA

Es en este punto donde aparece la principal complicación. Si bien teóricamente habría de ser 16,5 mCi/mmol se encuentran con alguna frecuencia errores en las actividades específicas de ciertos productos radioactivos. Considerando que en los experimentos descritos en esta Tesis un valor exacto de la actividad específica es esencial, se ha procedido a su determinación exacta. Baste como justificación el que la saturación \bar{Y} ó en otras palabras, el número de moléculas de antibiótico unidas por ribosoma, es directamente proporcional a la actividad específica del ligando. Este razonamiento es suficiente para descartar cualquiera de los métodos biológicos basados en la inhibición de sistemas acelulares de síntesis de proteínas.

Sin embargo, en este apartado se describe un pro-

cedimiento así mismo biológico para calcular con límites de error totalmente aceptables, el valor de la actividad específica de ^{14}C tricodermina.

Su origen estriba en la posibilidad de calcular la afinidad por el ribosoma de un antibiótico B no radioactivo, siempre que se cumplan dos requisitos esenciales: (a) la existencia de otro antibiótico A marcado con isótopos radioactivos y (b) que A y B se fijen reversiblemente al ribosoma y sean inhibidores competitivos entre sí (II.3.14). En nuestro caso particular tenemos $B \equiv ^{12}\text{C}$ tricodermina (se representa así, el antibiótico no radioactivo), $A \equiv ^{14}\text{C}$ tricodermina, y habiendo demostrado previamente la reversibilidad de la fijación de A, quien podría dudar de la de B, o mas aun, del caracter de competitividad entre A y B. El problema radica en que no conocemos $K_A(\text{TRIC})$ puesto que depende del valor de la actividad específica. Ahora bien observando la expresión

$$K_B = \frac{1}{[B]} \left(\frac{K_A - K'_A}{K'_A} \right) \quad \text{Ver II.3.14}$$

nos encontramos con que el valor entre paréntesis es un numero adimensional y puesto que K_A y K'_A (constante de asociación aparente determinada en presencia de una concentración fija de B) se ven afectadas en la misma proporción por el valor de la actividad específica, se puede tomar para esta, un valor arbitrario, por ejemplo el teorico 16,5 mCi/mmol, con lo que obtendríamos unos valores de K_A y K'_A distintos a los reales si 16,5 no fuera el valor

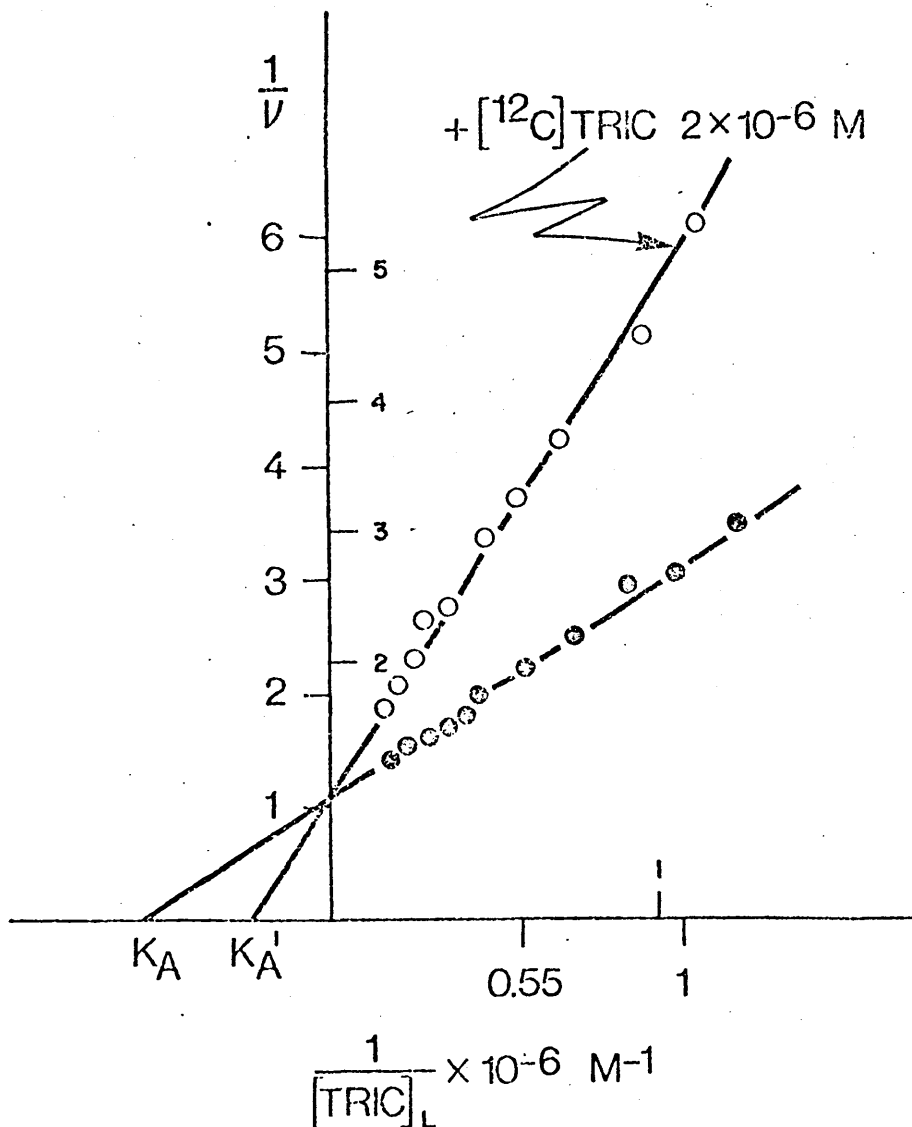


FIG.III.20. Cálculo de la actividad específica real de ^{14}C tricodermina.

- Interacción de ^{14}C tricodermina (de 0,005 a 0,03 ml de una solución $2 \times 10^{-5} \text{ M}$. Según A.e. 16,5 mCi/mmol) con ribosomas 80S de S.cerevisiae.
- Idem, en presencia de tricodermina $2 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Ribosomas $2,5 \times 10^{-6}$, 0°C y BFY. Explicación en el texto (III.3.3).

correcto; sin embargo la expresión $\frac{K_A - K'_A}{K'_A}$ no se verá afectada.

A partir de aquí y conociendo el valor B podemos calcular K_B que será la constante de asociación de la interacción de ^{12}C tricodermina con el ribosoma. Obviamente, en este caso $K_B \equiv K_A$ (TRIC). El parentesis nos servirá para indicar que estamos manejando valores reales.

Finalmente:

$$\frac{K_A \text{ (TRIC)}}{K_A} = \frac{\text{Actividad específica real (TRIC)}}{16,5 \text{ mCi/mmol}} \quad (1)$$

Los resultados experimentales obtenidos aparecen en la figura III.20. La escala interior (números pequeños) representa la considerada inicialmente (A.e. = 16,5 mCi/mmol) mientras que la exterior (números grandes) es la obtenida considerando que el punto de intersección de la recta $\bullet\text{---}\bullet$ con el eje de abscisas $-K_A$ (TRIC) corresponde a un valor de escala $0,55 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$.

La relación entre ambas escalas nos dará, según la expresión (1) el valor real de la actividad específica de la preparación de ^{14}C tricodermina: 15,4 mCi/mmol. El rendimiento final de la síntesis fué del 31% respecto al ^{14}C anhídrido acético.

La constante de asociación, así como el número de sitios por ribosoma $n = 0,93$ serán determinados con una mayor exactitud por los estudios de fijación posteriores (ver Capítulo IV).

Las condiciones experimentales fueron: en un volu-

men final de 0,08 ml, maleato amónico (pH 6,5) 50 mM, cloruro magnésico 12 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM (BFY), etanol 5% (v/v) (procedente de la solución de ^{14}C tricodermina), ribosomas $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ y ^{14}C tricodermina de 0,005 a 0,03 ml de una solución $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ considerando inicialmente la actividad específica de 16,5 mCi/mmol ($2,1 \times 10^{-5} \text{ M}$ según actividad específica real). Estos fueron todos los componentes para la recta ●—● mientras que la otra serie de tubos (representados por o—o) contenían además 160 pmoles de ^{12}C tricodermina por tubo ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$). El experimento fué realizado a la temperatura de 0°C mediante la técnica de centrifugación, tomándose alícuotas de 0,02 ml para estimación de radioactividad.

CAPITULO IV

IV.1 FIJACION DE ^3H ANISOMICINA A RIBOSOMAS EUCARIOTICOS

IV.2 FIJACION DE ^3H GOUGEROTINA A RIBOSOMAS

IV.3 FIJACION DE ^{14}C TRICODERMINA A RIBOSOMAS EUCARIOTICOS

IV.1. FIJACION DE ^3H ANISOMICINA A RIBOSOMAS EUCARIOTICOS

Todos los experimentos de fijación que aparecen en esta Tesis, descritos en los capítulos IV y V han sido realizados a la temperatura de 0°C (a excepción del descrito en el apartado IV.1.5).

IV.1.1. ESPECIFICIDAD DE LA INTERACCION DE ^3H ANISOMICINA CON RIBOSOMAS

Un antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas, solo interacciona con aquellos ribosomas sobre los que es activo. Más aun con la subunidad responsable de la actividad inhibidora. Esto fué primeramente demostrado en el año 1964 por Vázquez en el caso de cloranfenicol, siendo hoy día comunmente aceptado.

Anisomicina no había de ser una excepción. Por ello el primer experimento realizado con este antibiótico en forma radioactiva fué confirmar este aserto. La tabla IV.1 muestra que tan solo la subunidad mayor del ribosoma eucariótico -60S- es capaz de interaccionar con anisomicina. Esto demuestra que la especificidad en su modo de acción (ver Introducción) inhibiendo la formación de enlace peptídico (Battaner y Vázquez, 1971a) es consecuencia directa de su interacción con dicha subunidad, portadora del centro activo, peptidil transferasa (Vázquez y cols. 1969a).

TABLA IV.1

ESPECIFICIDAD DE LA FIJACION DE ^3H ANISOMICINA
A RIBOSOMAS Y SUS SUBUNIDADES

| Preparación | Fuente de obtención | mmoles de ^3H anisomicina unidos por mol de ribosomas |
|---------------|--------------------------------|---|
| Ribosomas 70S | <u>E.coli</u> | 0 |
| Ribosomas 80S | <u>S.cerevisiae</u> | 206 |
| Ribosomas 80S | Amígdalas palatinas humanas | 84 |
| Subunidad 60S | <u>S.cerevisiae</u> | 196 |
| Subunidad 40S | <u>S.cerevisiae</u> | 0 |

El experimento ha sido llevado a cabo por el método de ultracentrifugación. En todos los casos la concentración de ribosomas o subunidades fué $2,5 \times 10^{-6}$ M y la de ^3H anisomicina 10^{-6} M. Las condiciones iónicas fueron las correspondientes a cada sistema.

IV.1.2. FIJACION DE ^3H ANISOMICINA A RIBOSOMAS DE LEVADURA. EFECTO DE CATIONES Y pH.

Aunque posteriormente se estudiará este efecto en detalle se puede adelantar que la fijación de ^3H anisomicina a ribosomas no se ve prácticamente afectada por variaciones en la concentración de magnesio, iones monovalentes (amonio y potasio) ó de pH dentro de aquellos límites que no provoquen destrucción de la estructura ribosómica.

Es generalmente conocido que este tipo de condiciones, especialmente la concentración de magnesio es de suma importancia en aquellos sistemas acelulares que estudian una ó varias reacciones parciales del proceso de síntesis de proteínas, en general a bajas concentraciones de magnesio (3-5 mM) los procesos son enzimáticos mientras que a altas (15-20 mM) pueden obviarse muchos de los factores necesarios en un proceso fisiológico (factores de iniciación, EF T etc.). Sin embargo la formación de enlace peptídico ocurre siempre de forma enzimática siendo muy poco afectada por las condiciones iónicas. Independientemente del sistema utilizado, sus límites de viabilidad vienen dados por la interacción de los distintos sustratos con el centro activo.

Así la fijación de anisomicina, que ha de tener lugar en un sitio próximo, ó mejor dicho, muy relacionado con la peptidil transferasa, presenta unas características de insensibilidad a las condiciones iónicas del medio muy acordes

con esta región del ribosoma. En posteriores secciones comprobaremos que estas consideraciones pueden ser extrapoladas a la fijación de ^3H gougierotina y ^{14}C tricodermina.

Figura IV.1 muestra el efecto de cloruro amónico (Δ — Δ) y cloruro potásico (Δ — Δ). Las condiciones iónicas empleadas fueron: solución tampón TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM y cloruro magnésico 12 mM. Hay que tener presente que a las concentraciones de catión monovalentes expresadas en el eje de abscisas, hay que añadir 10 mM de amonio que es incorporado a la mezcla de reacción por la suspensión de ribosomas. Esto tiene especial importancia a concentración 0 del gráfico, pues es sabido que la ausencia de iones monovalentes provoca degradación de los ribosomas.

A partir de valores superiores a 100 mM no existe variación, siendo esta muy débil incluso a concentraciones netamente inferiores a las empleadas comunmente en los ensayos de síntesis de proteínas. (ver relación de soluciones tampón empleadas en esta Tesis).

Análogas consideraciones pueden hacerse en cuanto a la figura IV.2. En A, aparece el efecto de pH entre 6 y 8, límites que no afectan sustancialmente la estructura ribosómica. Las condiciones iónicas han sido: solución tampón 50 mM, cloruro magnésico 12 mM e ion amonio 100 mM. Acetato amónico (pH 6,0), maleato amónico (pH 6,5) y TRIS-ClH (pH 7,4 y pH 8,0) fueron los tampones empleados. En B, se representa el efecto del ion magnesio, siendo maleato amónico (pH 6,5) 50 mM el otro componente

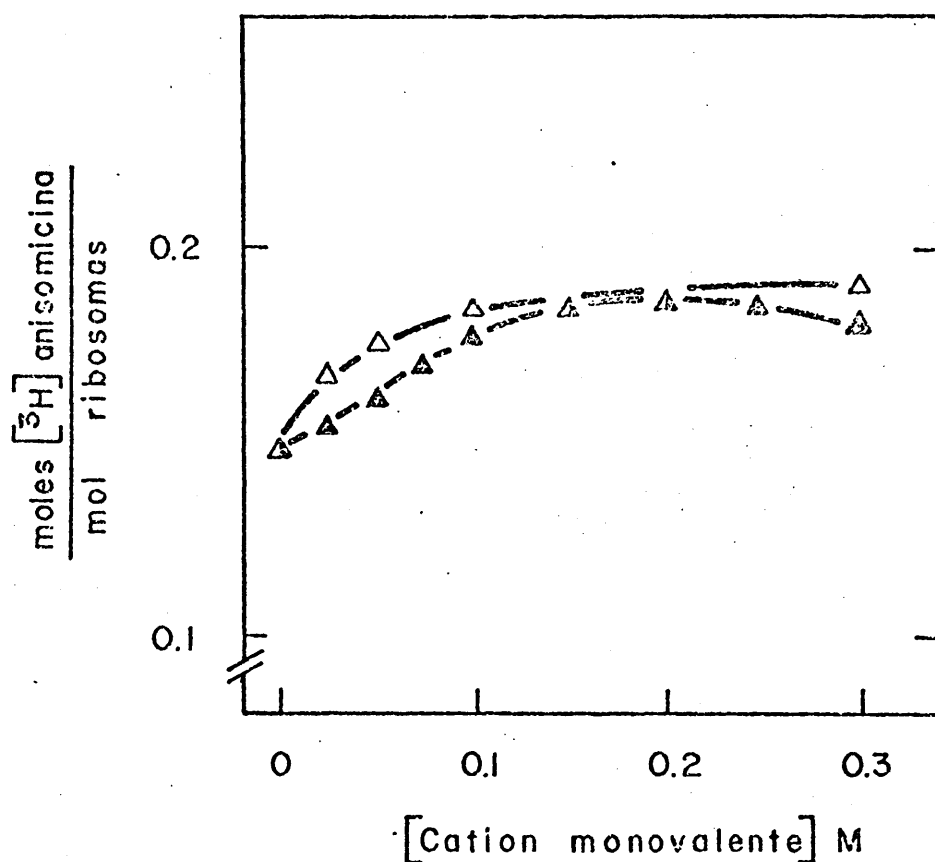


FIG. IV.1. Fijación de ^3H anisomicina a ribosomas de *S. cerevisiae*.

△ — △ Efecto de amonio

▲ — ▲ Efecto de potasio

Otras condiciones: TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, Cl_2Mg 12 mM, 0°C , ultracentrifugación, $2,5 \times 10^{-6}$ M y 10^{-6} M, ribosomas y ^3H anisomicina respectivamente.

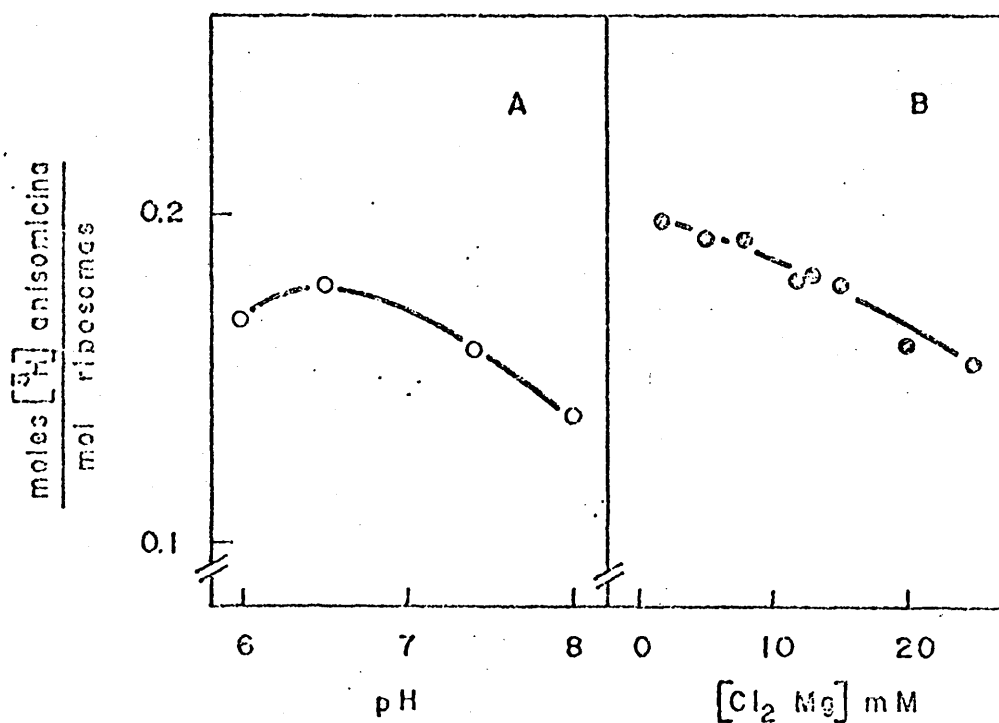


FIG.IV.2. Fijación de 3H anisomicina a ribosomas 80S de *S.cerevisiae*

- A. Efecto de pH.- Acetato amónico (pH 6,0) 50 mM, maleato amónico (pH 6,5) 50 mM y TRIS-ClH (pHs 7,2 y 8,0) 50 mM. Amonio, 100 mM y Cl_2Mg 12 mM estuvieron siempre presente.
- B. Efecto de magnesio.- Maleato amónico (pH 6,5) 50 mM y las cantidades requeridas de Cl_2Mg

Otras condiciones: $0^\circ C$, ultracentrifugación, 10^{-6} M de 3H anisomicina y $2,5 \times 10^{-6}$ M de ribosomas.

iónico de la mezcla de reacción. El resto de las condiciones experimentales aparece descrito en el apartado II.3.13 (Métodos).

Si bien las diferencias son mínimas (observese la ampliación de las escalas en ordenadas) aparece un "máximo" de fijación a pH 6,5 así como una creciente inhibición a medida que se incrementa la concentración de magnesio en el medio. No obstante, dado el carácter cualitativo de estas experiencias, no puede afirmarse si estas ligeras variaciones se deben a un efecto en la afinidad, en el número de sitios por ribosoma, ó en ambos.

IV.1.3. INTERACCION ^3H ANISOMICINA-RIBOSOMAS 80S (Scerevesiae)

Se ha estudiado en las condiciones iónicas descritas como BFY y consistentes en maleato amónico (pH 6,5) 50mM, cloruro magnésico 12 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM. A la vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior la elección de estas condiciones no presentaba ningún valor estricto pudiendo oscilar en un amplio margen. Las elegidas lo han sido sobre la base de haberse utilizado en la descripción del primer sistema acelular de levaduras capaz de sintetizar polifenilalanina (Ayuso y Heredia, 1968).

El resto de las condiciones empleadas fueron: ribosomas $1,5 \times 10^{-6}$ M para aquellos tubos con concentraciones de ^3H anisomicina entre 10^{-7} a 10^{-6} M; 3×10^{-6} M para el

rango 10^{-6} a 10^{-5} M y 6×10^{-6} M para concentraciones de antibiótico superiores a 10^{-5} M. Los volúmenes de reacción fueron 0,1, 0,08 y 0,06 ml respectivamente.

El método empleado fué el de centrifugación (0°C , 38.000 rpm durante 2 horas) tomándose alícuotas de 30, 20 y 10 microlitros (respectivamente) para determinación de radioactividad antes y después de la centrifugación tal y como se describió en Métodos.

Dado que la interacción anisomicina-ribosomas (en general todos los antibióticos que no se fijan irreversiblemente) es prácticamente instantánea, no hubo ningún periodo de incubación, puesto que el tiempo transcurrido en toma de alícuotas para radioactividad (antes de la centrifugación) y acondicionamiento de la centrifuga (vacío) para su funcionamiento, representan un periodo de tiempo infinitamente superior al requerido para alcanzar el equilibrio.

Los datos obtenidos de este experimento fueron representados según Scatchard (1949) obteniéndose la figura IV.3. De ella pueden deducirse según se especificó en el apartado de "cálculos" (II.3.14) que la aparición de una familia de m rectas significa la existencia de m tipos de fijación, con sus correspondientes n_i y K_{d_i} , distintos e independientes entre sí.

En nuestro caso tenemos que $m = 2$. Sin embargo esto no significa que todos los ribosomas de levadura sean capaces de fijar anisomicina de dos formas distintas e in-

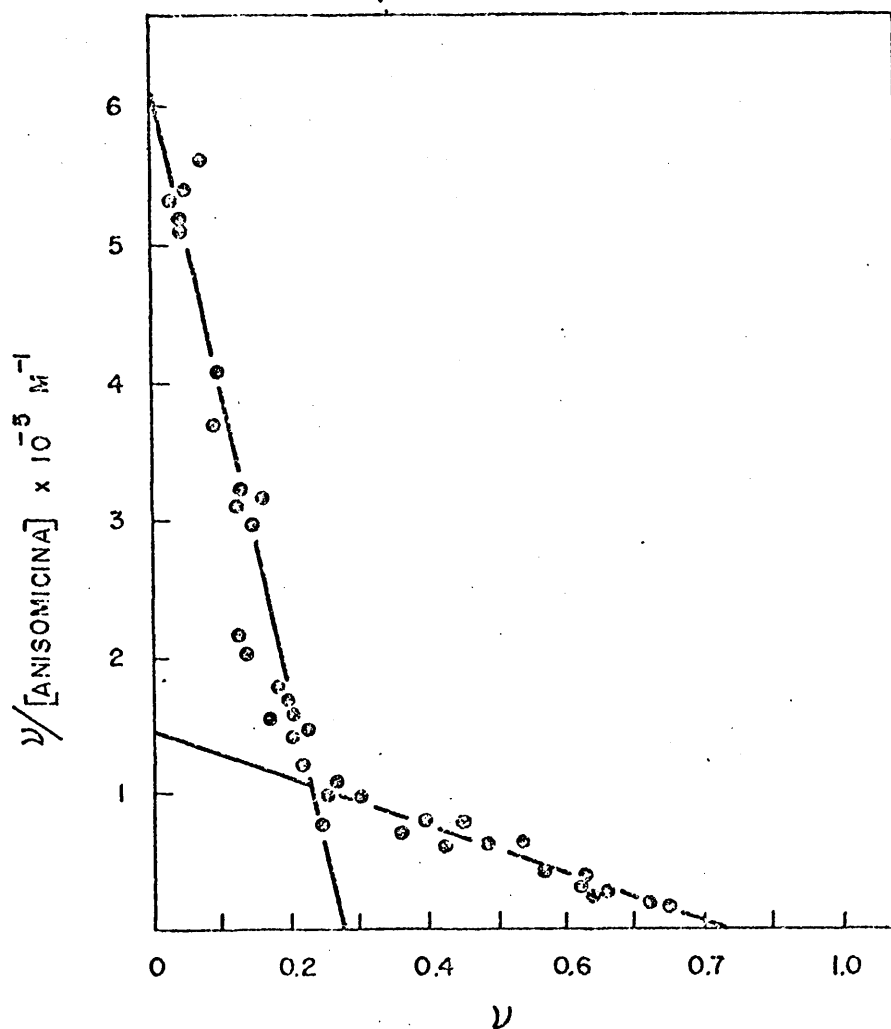


FIG.IV.3. Interacción de 3H anisomicina con ribosomas 80S de *S.cerevisiae*. Representación de Scatchard.

Condiciones experimentales: $0^{\circ}C$, BFY y ultracentrifugación. 1,5; 3 y $6 \times 10^{-6} M$ de ribosomas para los intervalos 10^{-7} - $10^{-6} M$ 10^{-6} - $10^{-5} M$ y $> 10^{-5} M$ de 3H anisomicina respectivamente.

dependientes. La clave para explicar este resultado nos la da el eje de abscisas. Vemos que la saturación máxima para infinita concentración de anisomicina libre en el equilibrio, alcanza un valor ligeramente inferior a 1. Considerando que siempre hay una pequeña proporción de ribosomas inactivos (proceso de aislamiento, posterior degradación) podemos concluir que cada ribosoma 80S de levadura, fija una molécula de anisomicina. Entonces el significado de las dos pendientes aparece trivial: hay dos poblaciones de ribosomas, unos -28% del total- fijan ^3H anisomicina con alta afinidad, dada por la inversa del valor de la pendiente cambiada de signo que en este caso resultó ser $K_{d1}^{0^\circ\text{C}} = 4,3 \times 10^{-7} \text{ M}$ y otros -56% del total- que interaccionan con el antibiótico con una afinidad menor definida por $K_{d2}^{0^\circ\text{C}} = 5,8 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Este resultado difiere sustancialmente de los encontrados al estudiar la interacción de inhibidores con ribosomas de bacterias (Fernández-Muñoz y cols. 1971), (Mao y Putterman, 1969) (Fernández-Muñoz y Vázquez, 1973) en donde todos los ribosomas se comportaban homogéneamente dando un complejo equimolecular.

Con efecto de comprobar la no artificialidad de este resultado se sustituyó la técnica de ultracentrifugación por diálisis de equilibrio. Las condiciones iónicas fueron lógicamente las mismas, mientras que las concentraciones de ribosomas y antibiótico variaron ligeramente: $1,6 \times 10^{-6}$ de los primeros para 10^{-7} - 10^{-6} M de ^3H anisomicina y $3,2 \times 10^{-6} \text{ M}$ para el rango 10^{-6} - 10^{-5} M . Puede observarse que

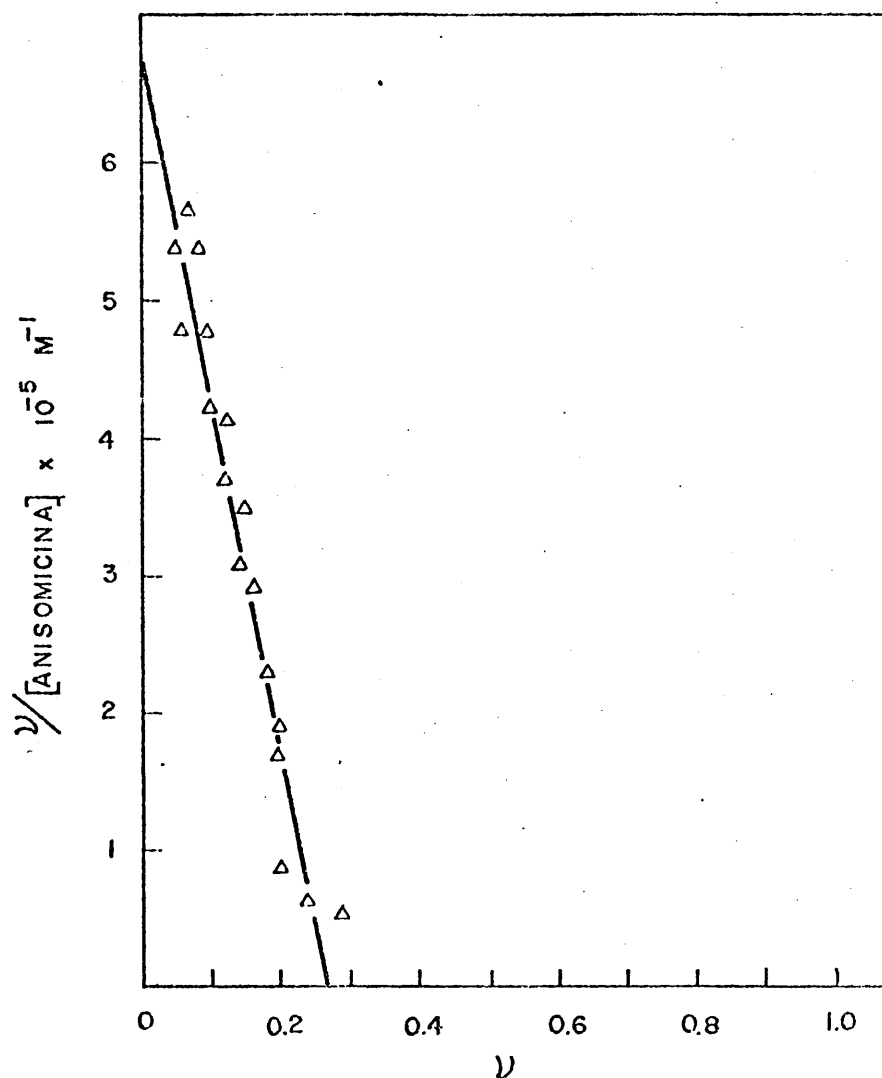


FIG. IV.4. Interacción de ^3H anisomicina con ribosomas 80S de *S. cerevisiae*. Diálisis de equilibrio

^3H anisomicina estuvo presente en un rango de concentración 10^{-7} - 10^{-6} M ($1,6 \times 10^{-6}$ M de ribosomas) y 10^{-6} - 10^{-5} M ($3,2 \times 10^{-6}$ M de ribosomas). Otras condiciones BFY, 0°C de temperatura y 7 horas de agitación.

las concentraciones mas elevadas, tanto de macromolécula como de ligando, no han sido empleadas. Ello se debió a que la viscosidad provocada por soluciones superiores a 5×10^{-6} M de ribosomas podía alterar el equilibrio necesario a ambos lados de la membrana de diálisis. Consecuencia directa de esta limitación fué detectar tan solo la fijación de alta afinidad.

El resto de las condiciones experimentales fueron: 0,1 ml de volumen final en cada lado de la membrana de diálisis y 7 horas de agitación (ver Métodos) en un baño mezcla de hielo y agua. En un experimento previo se comprobó que añadiendo inicialmente ^3H anisomicina a ambos compartimentos de la camara de diálisis, el equilibrio se alcanzaba a las 6 horas de agitación.

El resultado, siempre según la representación de Scatchard, aparece en la figura IV.4. Como ya se indicó anteriormente limitaciones técnicas impidieron la detección de la fijación a ribosomas de baja afinidad. Sin embargo la identidad total entre el método de ultracentrifugación y el de diálisis en el rango de concentraciones utilizado da total valor al experimento en la figura IV.3.

IV.1.4. INTERACCION ^3H ANISOMICINA CON SUBUNIDADES RIBOSOMICAS DE S.cerevisiae.

El primer experimento realizado con ^3H anisomicina, consistente en su interacción con el ribosoma 80S de leva-

dura, ha dejado planteada una serie de incógnitas. La más importante y a su vez más difícil de contestar es, que significado tiene esta diferencia ribosómica detectada según su afinidad por este antibiótico. De esto nos ocuparemos en la Discusión. Por ahora me limitaré a tratar de responder a otra pregunta mas inmediata y con mas posibilidades de ser contestada: donde radica esta heterogeneidad.

Considerando que ^3H anisomicina solo es capaz de interaccionar con la subunidad 60S del ribosoma eucariótico, parece evidente tratar de localizar en ella los resultados obtenidos con el ribosoma completo. Así repitiendo el experimento descrito en el apartado anterior para 80S (método de ultracentrifugación) se obtuvo la figura IV.5, después de procesar convenientemente los datos obtenidos de las estimaciones de radioactividad. La afinidad se ha reducido a $K_d^{60S} = 1,7 \times 10^{-6} \text{ M}$ sin embargo el dato mas importante aportado por este experimento, consiste en mostrar que todas las subunidades 60S son homogéneas en cuanto a su afinidad por ^3H anisomicina. El hecho de que el número de sitios por ribosoma sea 0,67 es una consecuencia normal de la degradación provocada en la obtención de las subunidades. Este fenómeno es así mismo común a las subunidades procarióticas de estabilidad mas acusada.

Se puede concluir que la distinta afinidad ribosómica para la interacción con anisomicina no radica en el "sitio de fijación" del antibiótico, puesto que todas las subunidades 60S que permanecen activas tras su obtención (67%) fijan una

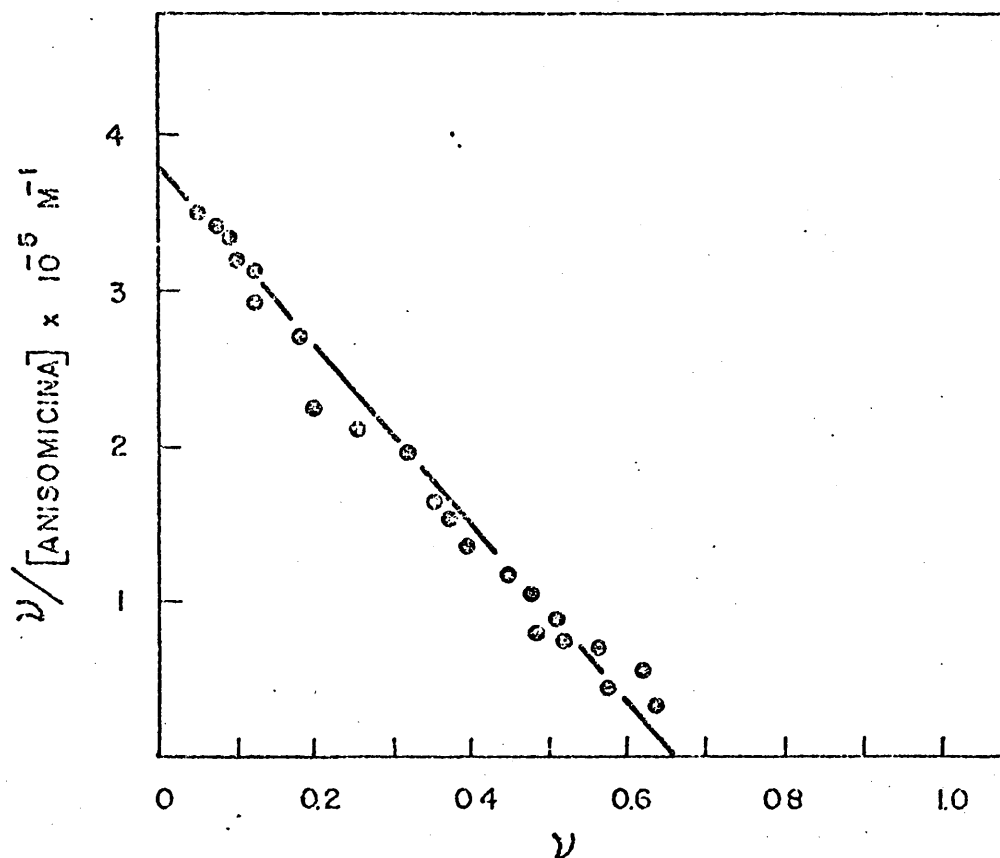


FIG.IV.5. Interacción de ^3H anisomicina con subunidades 60S de *S.cerevisiae*. Representación de Scatchard.

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las descritas en la Figura IV.3 a excepción del tiempo de centrifugación: 6 horas.

Las subunidades no fueron pretratadas en modo alguno.

molécula de anisomicina con una afinidad común para todas ellas, definida según el valor de $K_d^{60S} = 1,7 \times 10^{-6} M$, aproximadamente 3,5 veces inferior a $K_{d1}^{0^\circ C}$ y superior a $K_{d2}^{0^\circ C}$.

Una vez descartada la subunidad 60S como responsable de la heterogeneidad ribosómica aparecieron de nuevo dos posibilidades para explicar el fenómeno: (a) un componente no ribosómico, que se eliminaría en la centrifugación zonal (II.2.11) mediante la que se obtenían ambas subunidades y (b) la subunidad 40S introducía de una forma indirecta, el carácter heterogeneo del ribosoma 80S. Para responder a esta cuestión fué necesario hacer un experimento de "reconstitución", es decir formar partículas 80S a partir de cantidades equimoleculares de subunidades ($1,3 \times 10^{-6} M$) y analizar su comportamiento en cuanto a la fijación de 3H anisomicina. Se incubaron, para su reactivación durante 15 minutos a $30^\circ C$. Una vez enfriadas a $0^\circ C$ se añadieron las cantidades requeridas de antibiótico y se realizó el experimento según la técnica clásica de ultracentrifugación.

El resultado aparece en la figura IV.6 donde puede apreciarse que retornamos a la situación obtenida con ribosomas intactos, es decir la hipótesis (b) en la que se atribuía la heterogeneidad a un efecto indirecto de la subunidad 40S parece ser correcta. No obstante deben tenerse en cuenta una serie de puntualizaciones.

- La segunda pendiente (en línea discontinua) no ha podido ser detectada con toda la precisión requerida para quedar

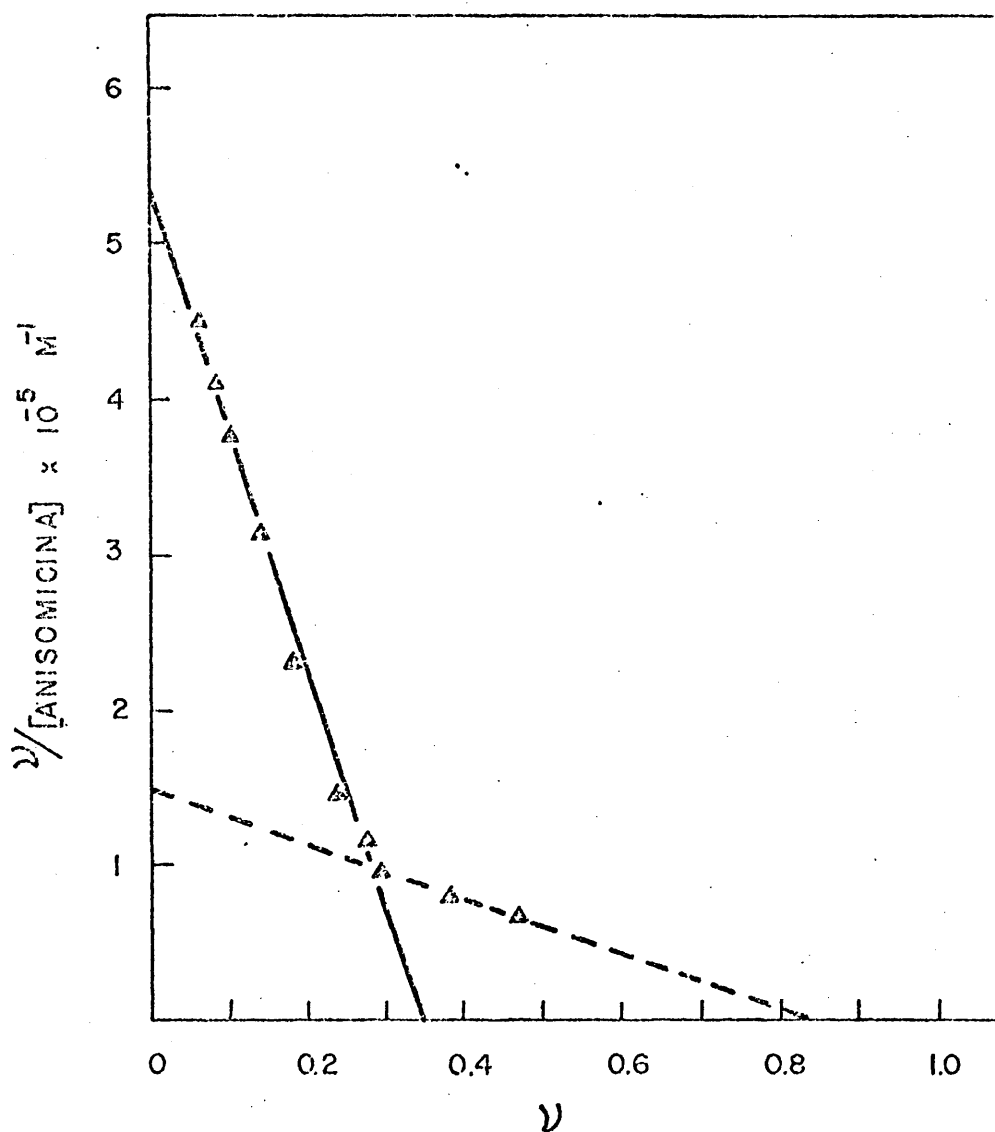


FIG.IV.6. Fijación de ^3H anisomicina a ribosomas 80S de *S.cerevisiae* reconstituidos a partir de sus subunidades. Representación de Scatchard.

Cond.experimentales: 0°C , BFY, ultracentrifugación.
 ^3H anisomicina $2,5 \times 10^{-7} - 10^{-5}$ M. Subunidades
 (previamente incubadas 30°C durante 15 minutos)
 $1,3 \times 10^{-6}$ M.

completamente caracterizada, debido a las grandes cantidades de subunidades necesarias.

- El número total de ribosomas reconstituidos activos es ligeramente inferior a los "intactos" pero superior al de las subunidades 60S aisladas. Dos explicaciones pueden justificar este fenómeno. La apuntada anteriormente ó una reactivación producida por la incubación a 30°C en presencia de la subunidad complementaria.

- El porcentaje de ribosomas capaces de fijar ^3H anisomicina ha incrementado ligeramente (de un 28 a un 35%).

- Frente a esta hipótesis podría argumentarse que la explicación a la figura IV.6 estribaría en una degradación ó inactivación de subunidades 60S, debido a condiciones experimentales o mejor aun a "atrapamiento" por subunidades 40S inactivas que provocarían ribosomas 80S "inactivos" siendo la fijación detectada, la correspondiente a subunidades 60S de caracter homogéneo tal y como apareció en la figura IV.5 pero donde tan solo un 35% de ellas quedaran activas, mientras que la segunda fijación podía ser un artefacto dado los pocos puntos que la definen. Esta interpretación de cierta viabilidad atendiendo a los resultados en "el eje de abscisas" pierde totalmente su valor al considerar las afinidades obtenidas en este experimento. Para fijación de mas alta afinidad: $K_{d1}^R = 5,7 \times 10^{-7} \text{ M}$ (frente a $K_{d1}^{0^\circ\text{C}} = 4,3 \times 10^{-7} \text{ M}$ y $K_d^{60\text{S}} = 1,7 \times 10^{-6} \text{ M}$) y $K_{d2}^R = 5,6 \times 10^{-6} \text{ M}$ (frente a $K_{d2}^{0^\circ\text{C}} = 5,8 \times 10^{-6} \text{ M}$). Vemos que a pesar que $K_{d1}^R > K_{d1}^{0^\circ\text{C}}$ sus valores estan mucho mas próximos que respecto a $K_d^{60\text{S}}$. Además

hay que considerar que una pequeña disminución en el valor de la afinidad puede ser perfectamente explicada por pérdida de algún componente no ribosómico o mejor aun por un relajamiento de la estructura ribosómica, fenómeno generalmente admitido en partículas que han sufrido las drásticas condiciones de disociación (BDY, ver relación de soluciones tampón). Sin embargo, un incremento de 3 veces en afinidad ($K_d^{60S} = 3 \times K_d^R$) solo puede ser explicado por un cambio profundo en la estructura ribosómica: reasociación de 40S y 60S para dar lugar al ribosoma 80S.

Respecto al incremento en el valor de n para la fijación de alta afinidad apuntado un poco mas arriba, se hizo el siguiente experimento. Se tomaron una determinada cantidad de ribosomas que fué dividida en 2 porciones. Una de ellas se diluyó en BFY mientras que la otra lo fué en tampón de disociación BDY. Se incubaron 1 hora a 0°C y a continuación se añadieron las cantidades de sales necesarias para convertir el tampón BDY, en que se encontraban la mitad de los ribosomas, en BFY. A continuación se incubaron 15 minutos a 30°C y se realizó un estudio de fijación de ^3H anisomicina tal y como quedó descrito en IV.1.3. En realidad lo que se hizo fué disociar ribosomas en sus subunidades y reasociarlos, es decir un experimento similar al descrito en la figura IV.6 excepto que aquí no han sido aisladas las subunidades. Paralelamente se hizo un ensayo standard de fijación con los otros ribosomas (Idéntico al descrito en IV.1.3). Los resultados aparecen en la figura

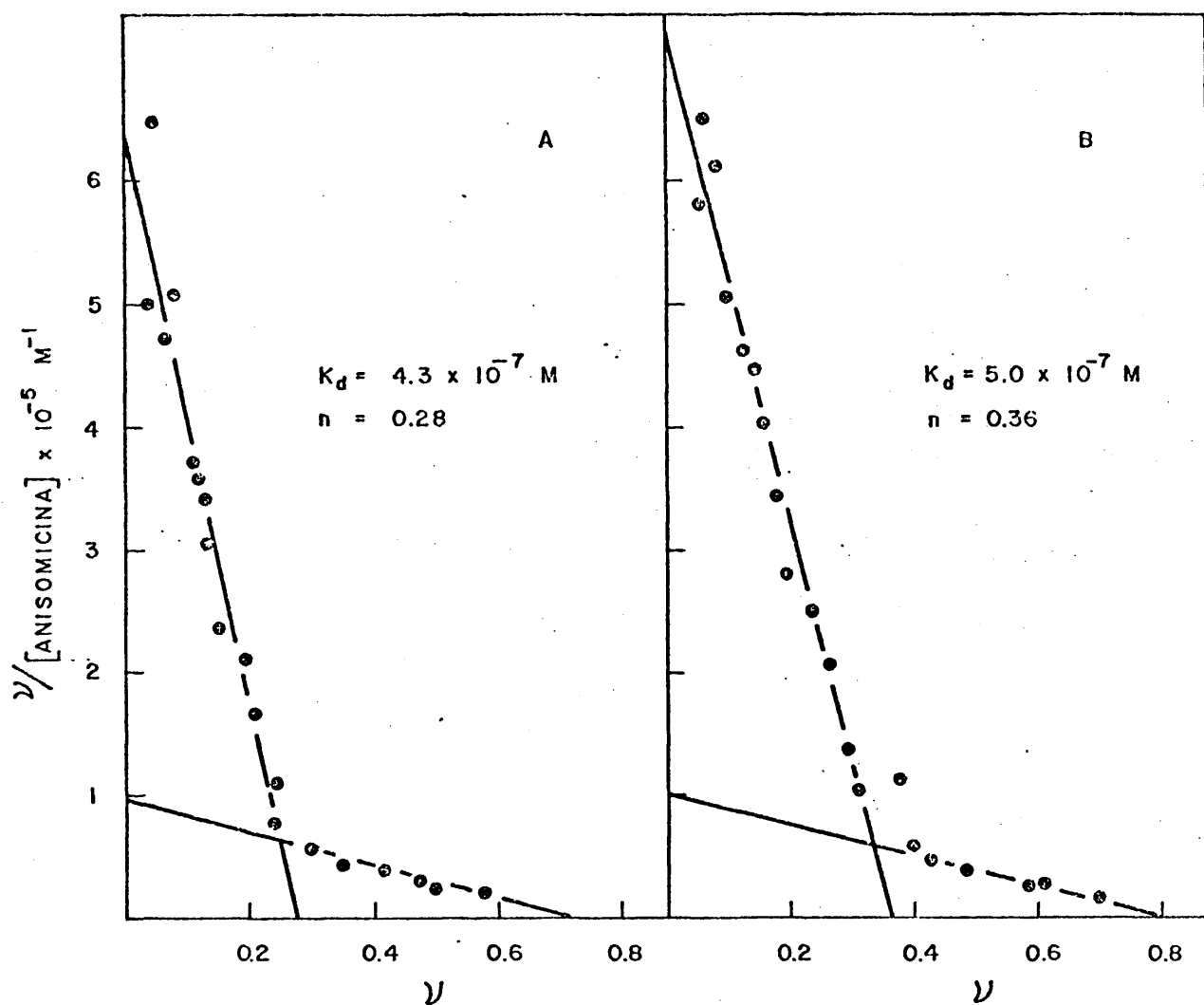


FIG.IV.7. Fijación de ^3H anisomicina a ribosomas de *S.cerevisiae*. Representación de Scatchard.

- A. Experimento control, ribosomas no tratados
- B. Ribosomas disociados, mediante incubación en BDY a 0°C durante 1 hora y reconstituidos en BFY por incubación 15 minutos a 30°C .

Condiciones experimentales: BFY, 0°C , ultracentrifugación.

IV.7 . Vemos que mientras el ensayo standard (Fig. IV.7A) es idéntico al presentado en la figura IV.3 (este resultado se repitió con 4 preparaciones distintas de ribosomas) los ribosomas disociados y reasociados (Fig. IV.7B) han incrementado ligeramente el tanto por ciento de ribosomas activos ($n = 0,36$) coincidiendo con lo obtenido en el experimento de reasociación a partir de subunidades aisladas, mientras que los valores de las afinidades han sufrido variaciones menores, si bien puede apreciarse una ligera disminución en los ribosomas disociados (de $4,3$ a $5,0 \times 10^{-7}$ M). El significado de estas variaciones obtenidas al disociar el ribosoma serán discutidas posteriormente.

Antes de concluir este apartado conviene señalar que cuando se hizo el experimento de "reconstitución" empleando concentraciones de subunidades próximas a 3×10^{-6} M se obtuvo una situación similar (en el valor de n y de K_d) a la correspondiente a subunidades 60S. Este resultado dada la cantidad de material necesario no ha sido aun confirmado y se basa tan solo en una representación gráfica de 4 puntos. Sin embargo, es muy probable que sea debido a que tan altas concentraciones de subunidades (muy lejos de las fisiológicas) no puedan reasociar convenientemente. Es siempre recomendable, aún en el caso de ser imprescindible usar tales concentraciones ribosómicas, que la reconstitución tenga lugar en condiciones mas diluidas siendo concentradas posteriormente.

IV.1.5. CORRELACION FIJACION ^3H ANISOMICINA- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD PEPTIDIL TRANSFERASA.

1.- REACCION DE LA PUROMICINA.

La interacción de inhibidores en forma radioactiva con el ribosoma presenta la ventaja de suministrar datos cuantitativos. Así hemos podido determinar en cada caso, el porcentaje de ribosomas con una (alta afinidad) u otra (baja afinidad) característica. Sin embargo presenta el inconveniente de no tener ningún dato acerca de la funcionalidad de estos ribosomas dentro de alguna de las etapas de la síntesis de proteínas.

Los experimentos descritos en este y en el siguiente apartado, son un intento de correlacionar los datos cuantitativos de fijación, con una medida de la actividad ribosómica peptidil transferasa, presentada por los dos tipos de ribosomas diferenciados según su interacción con ^3H anisomicina.

El fundamento es el siguiente, aislando la formación de enlace peptídico del resto de las etapas necesarias para la biosíntesis de proteínas, se puede correlacionar la inhibición causada por anisomicina con la afinidad que esta posee por el ribosoma y de esta forma distinguir, si es que hubiera alguna diferencia, entre la actividad de ambos tipos de ribosomas en esta reacción específica.

El método seguido ha sido: 1) estudiar la fijación de ^3H anisomicina a ribosomas 80S de levadura en las condi-

ciones de formación de enlace peptídico según la "reacción de la puromicina" (ver II.3.8). Estas son sustancialmente las mismas que las descritas en IV.1.3 excepto que la temperatura fué de 30°C durante todo el proceso. 2) Calcular las curvas teóricas de inhibición deducidas a partir de los valores de $K_{d1}^{30^{\circ}\text{C}}$ y $K_{d2}^{30^{\circ}\text{C}}$. 3) Analizar la cinética de reacción con puromicina del complejo N·Ac ^{14}C Fen·tRNA-Poli U-ribosomas en su forma postranslocada, con objeto de estudiar la inhibición del antibiótico en condiciones de velocidad inicial. 4) Estudiar el efecto de anisomicina sobre la "reacción de la puromicina" a velocidades iniciales.

Los experimentos realizados y los resultados conseguidos se describen a continuación.

Todas las condiciones experimentales fueron idénticas a las descritas en IV.1.3 a excepción de que los tubos de reacción se incubaron 15 minutos a 30°C antes de iniciar la centrifugación. Así mismo, el rotor se encontraba a esta temperatura y la sedimentación tuvo lugar a 30°C durante 3 horas. Esto se debió a que esta temperatura los sedimentos de ribosomas no eran demasiado estables cuando la centrifugación duraba tan solo 2 horas.

Los resultados aparecen en la figura IV.8. La situación es similar a la obtenida a 0°C si bien los parámetros han variado: la fijación de alta afinidad la poseen un 37% de los ribosomas y su intensidad viene dada por $K_{d1}^{30^{\circ}\text{C}} = 1,2 \times 10^{-6} \text{ M}$ (aproximadamente 3 veces inferior a $K_{d1}^{0^{\circ}\text{C}}$) mientras que un 43% de ribosomas interaccionan con anisomicina se-

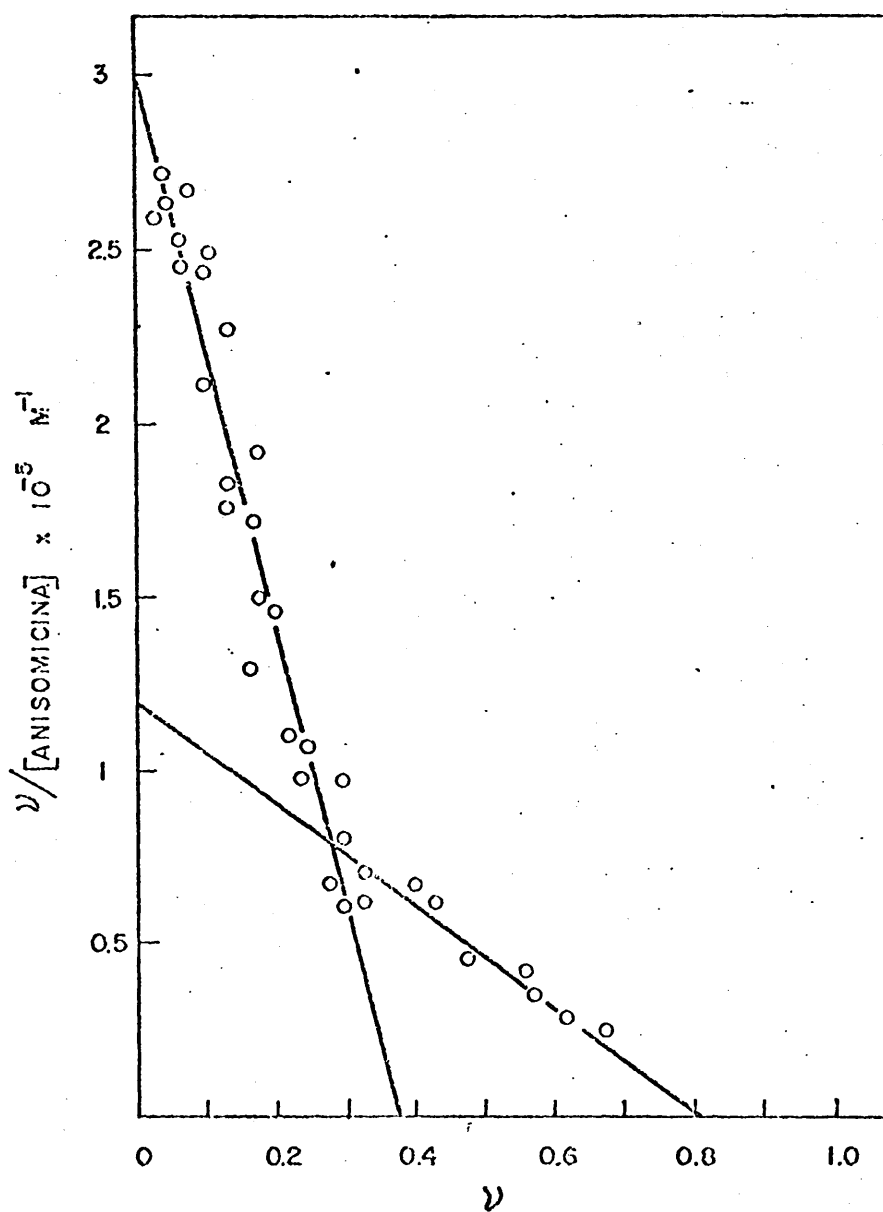


FIG.IV.8. Representación según Scatchard de la interacción de 3H anisomicina con ribosomas 80S de *S.cerevisiae* a 30°C.

Todas las condiciones experimentales como en la Figura IV.3 a excepción de la temperatura y 3 hr. de centrifugación (ver texto).

gún una fijación de baja afinidad ($K_{d2}^{30^{\circ}\text{C}} = 6,6 \times 10^{-6} \text{ M}$) ligeramente inferior a la correspondiente a 0°C .

A partir de estos valores de $K_{d1}^{30^{\circ}\text{C}}$ y $K_{d2}^{30^{\circ}\text{C}}$ pueden trazarse las curvas teóricas de inhibición admitiendo una premisa inicial: un ribosoma formando complejo con anisomicina es inactivo en cuanto a su actividad peptidil transferasa y como consecuencia, frente a una concentración dada de antibiótico, el porcentaje de inhibición respecto a los controles sería idéntico al tanto por ciento de ribosomas complejados en el equilibrio. Luego, conociendo el valor de las constantes de afinidad (en forma de constantes de asociación) y la concentración inicial de ribosomas, se puede calcular mediante un sencillo sistema de dos ecuaciones el valor de la saturación \bar{y} es decir, el porcentaje de inhibición para cada concentración de anisomicina.

Suponiendo que $n = 1$ puesto que todos los ribosomas denominados de alta afinidad fijan 1 molécula de antibiótico y $R_o = n_1 \times R_T$ donde R_T son los ribosomas añadidos a la mezcla de reacción y n_1 el porcentaje de los que fijan anisomicina según $K_{d1}^{30^{\circ}\text{C}}$, tenemos:

$$\bar{y} = \frac{(RA)}{R_o} = \frac{K(A)}{1 + K(A)}$$

$$A_o = (A) + (RA)$$

donde K es K_A ($1/K_{d1}^{30^{\circ}\text{C}}$ ó $1/K_{d2}^{30^{\circ}\text{C}}$). A_o concentración total de anisomicina y el resto, según II.3.14.

Resolviendo este sistema para (RA) tenemos:

$$K(RA)^2 - [1 + K(A_o + R_o)](RA) + K A_o R_o = 0$$

de donde:

$$\bar{y} = \% \text{ de inhibición} = \frac{1 + K(A_o + R_o) \pm \sqrt{[1 + K(A + R_o)]^2 - 4K^2 A_o R_o}}{2KR_o}$$

ecuación en la que la solución + no es viable pues entonces $(RA) > R_o$.

Se aplicó una corrección a estos cálculos basada en la cantidad de anisomicina que quedaría eliminada de la mezcla de reacción por el otro tipo de ribosomas. Se obtuvo idéntico resultado habida cuenta de la pequeña concentración de ribosomas empleada frente a las elevadas cantidades de anisomicina. Los resultados aparecen en la figura IV.10. La línea de trazo grueso corresponde a $K_{d1}^{30^\circ C}$ y la de trazo fino a $K_{d2}^{30^\circ C}$ mientras que los círculos blancos, unidos por la línea discontinua, representan el valor experimental obtenido según se describe a continuación. Previamente fué necesario determinar el tiempo de incubación requerido para estudiar auténticas velocidades iniciales, puesto que dada la reversibilidad del complejo, este requisito es fundamental para admitir como buena la premisa enunciada al trazar las curvas teóricas de inhibición. Como puede observarse en la figura IV.9A, por encima de 2 minutos se pierde la linealidad. En el caso de que el complejo hubiera sido congelado y almacenado durante 24 horas esta cinética era un poco mas lenta, encontrándose linealidad aun a los 4 minutos de incubación.

Una vez en posesión de este dato se procedió a determinar la curva de inhibición de esta reacción por canti-

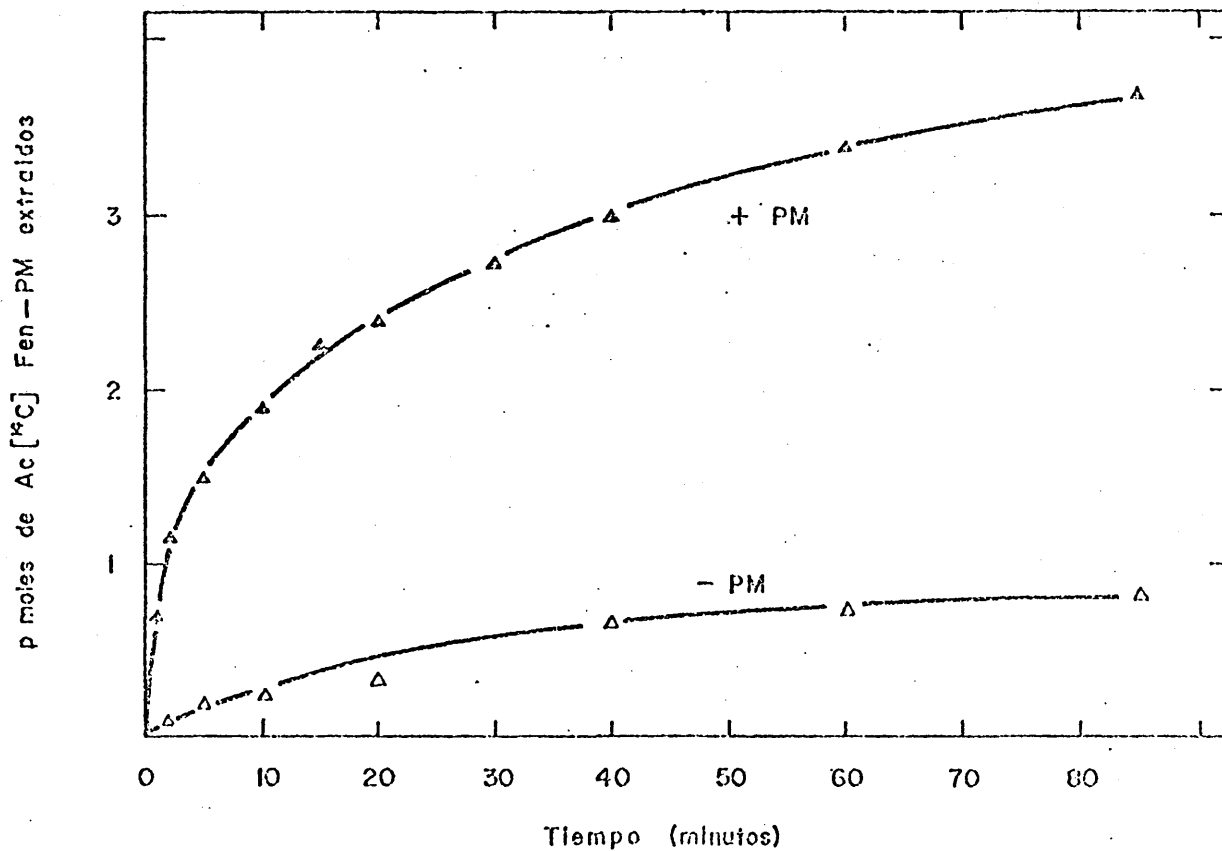


FIG.IV.9A. Cinética de la reacción de la puromicina a partir del complejo ribosomas 80S (*S.cerevisiae*)-poli U-N·Ac ¹⁴C Fen·tRNA.

Condiciones experimentales: BFY, 30°C de temperatura y una cantidad de complejo equivalente a 28,2 pmoles de Fenilalanina. Δ — Δ puromicina 1 mM y Δ — Δ sin puromicina.

dades crecientes de anisomicina. Las condiciones iónicas fueron idénticas a las empleadas en los estudios de fijación (BFY): Maleato amónico (pH 6,5) 50 mM, cloruro magnésico 12 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM. La incubación duró 2 minutos a 30°C deteniéndose la reacción y extrayéndose el producto N-Ac ^{14}C .Fen-PM formado, de acuerdo al método de Leder y Bursztyn (1966) según se ha descrito en la sección II.3 de Métodos.

Es muy importante recordar la necesidad de hacer para cada concentración de anisomicina empleada, un tubo control idéntico sin puromicina. Esto se debe a que el antibiótico provoca a altas concentraciones un incremento en la liberación de N-Ac ^{14}C fenilalanina (Fig. IV.9B) que es extraída mediante el acetato de etilo. Estas cantidades son mínimas, pero en aquellas condiciones en que debido a la presencia de altas concentraciones de anisomicina el porcentaje de reacción es pequeño, puede producir considerables variaciones. Este fenómeno encontrado tan solo con anisomicina recuerda los resultados de Caskey y cols. (1971) cuando estudiaron el efecto de este antibiótico sobre la liberación de formil-metionina en su ensayo de terminación (ver mas adelante, IV.1.9).

El resultado, una vez tenidas en cuenta estas condiciones, aparece en la figura IV.10 representado por los círculos blancos unidos por la línea discontinua. La inhibición producida por anisomicina según se observa, corresponde a una fijación definida por $K_{d1}^{30^\circ\text{C}}$. Esto quiere decir que los

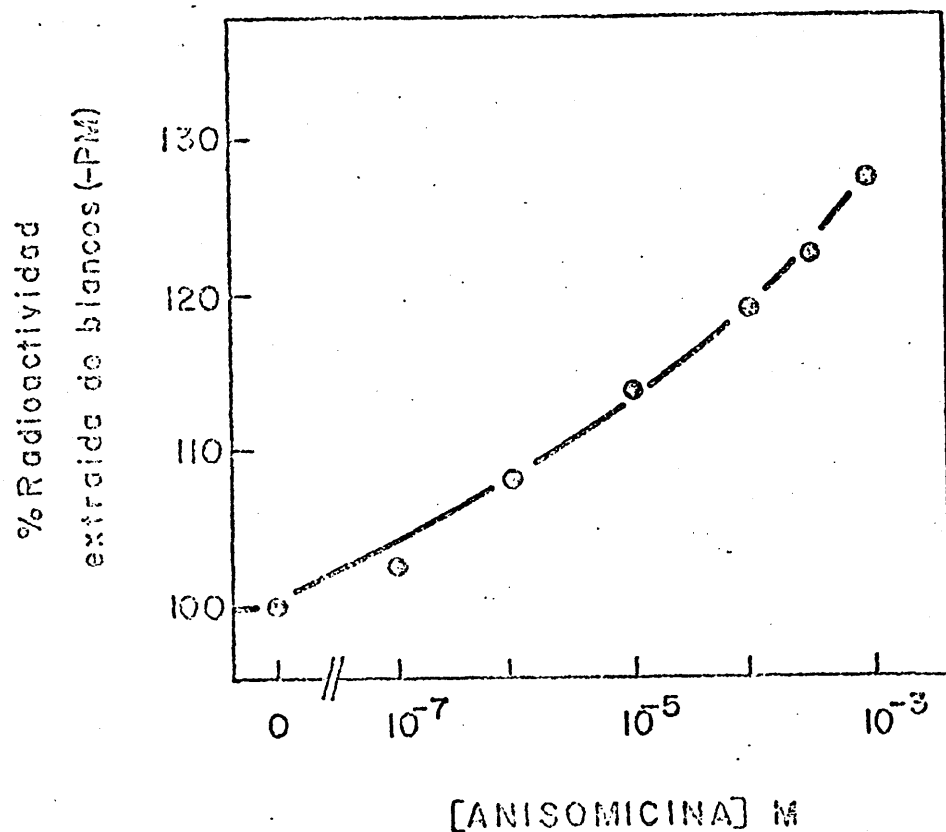


FIG.IV.9B. Efecto de anisomicina sobre la extracción de radioactividad en "la reacción de la puromicina" en ausencia de puromicina.

Valor de la radioactividad extraída según el método de Leder y Bursztyn (1966) en los blancos (tubos sin puromicina) correspondientes al experimento referido en Figura IV.10.

ribosomas de baja afinidad no poseen actividad peptidil transferasa puesto que el producto sintetizado por ellos hubiera sido inhibido por anisomicina en una extensión mucho menor que la encontrada experimentalmente (línea de trazo fino), y aún considerando que ambos tipos de ribosomas hubieran sido capaces de formar enlace peptídico, una simple consideración matemática nos dice que el resultado esperado hubiera sido una recta, combinación lineal de las dos teóricas y situada a una distancia relativa de ambas, directamente proporcional al número de ribosomas que componen cada uno de los grupos de distinta afinidad por ^3H anisomicina, esto es $n_1^{30^\circ\text{C}}$ y $n_2^{30^\circ\text{C}}$.

Así podemos concluir que tan solo los ribosomas (o una parte de ellos) capaces de interaccionar con anisomicina con alta afinidad poseen actividad formadora de enlace peptídico en el sistema aquí utilizado. Esto no excluye que un pequeño porcentaje de ribosomas del tipo de baja afinidad no posea esta actividad debido a los límites de error de estas experiencias.

Puede observarse en la figura IV.10 que a altas concentraciones de anisomicina existe una ligera desviación de la curva teórica. Esto no puede explicarse por ningún efecto de los componentes de la reacción sobre anisomicina puesto que entonces la desviación debiera haberse producido a bajas concentraciones del antibiótico. Tampoco puede argüirse una diferente afinidad por el complejo postranslocado (K_{d1} y K_{d2} (30°C)) han sido determinadas sobre el riboso-

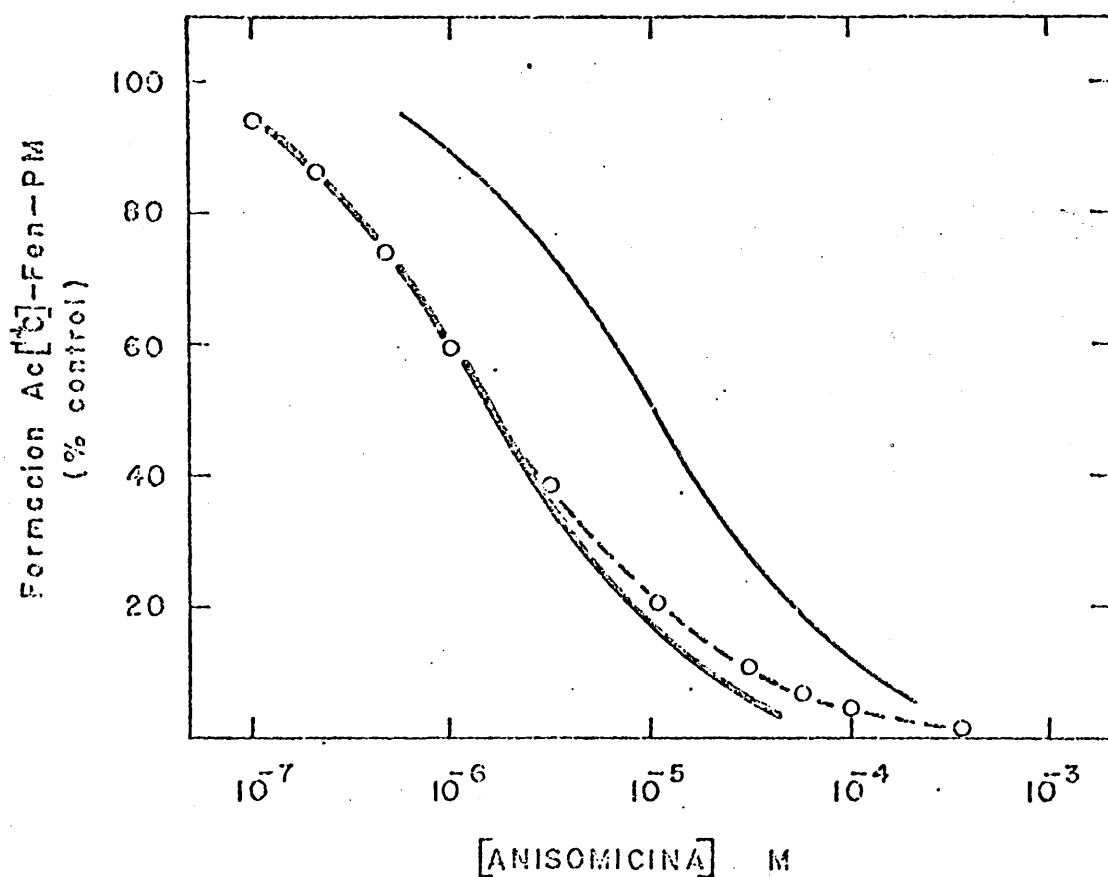


FIG. IV.10. Reacción de la puromicina a partir del complejo postranslocado. Sistema de levadura.

- Curva de inhibición teórica según $K_{d1}^{30^{\circ}\text{C}}$
 - Idem según $K_{d2}^{30^{\circ}\text{C}}$
 - o---o Curva de inhibición experimental
- Incubación 2 minutos a 30°C .

ma) puesto que el resultado hubiera sido una curva de inhibición paralela a las teóricas. Así solo podía ser explicado por efectos de agregación del antibiótico a altas concentraciones que rebajarían su concentración real en la reacción aunque esta versión es muy improbable. Mucho mas acorde con la realidad resulta suponer que a pesar del efecto inhibidor de anisomicina se permita, en muy pequeñas cantidades, una cierta síntesis de N·Ac·Fen-PM debido a que el complejo ribosomas-anisomicina no es estático sino dinámico. Esta síntesis se haría tanto mas ostensible cuanto mayor fuera el grado de inhibición, es decir, menor síntesis debida a la población de ribosomas no unida al antibiótico. Esta explicación resulta tanto mas factible en cuanto consideremos el equilibrio $R + A \rightleftharpoons RA$ desde un punto de vista termodinamicamente estadístico.

Las conclusiones obtenidas en este apartado han sido confirmadas mediante el otro ensayo específico para la formación de enlace peptídico: "La reacción del fragmento" (Battaner y Vázquez, 1971a)

IV.1.6. CORRELACION FIJACION ^3H ANISOMICINA-INHIBICION DE LA ACTIVIDAD PEPTIDIL TRANSFERASA.

2.- REACCION DEL FRAGMENTO.

El proceso seguido fué paralelo al descrito para la reacción de la puromicina. Asi mismo todas las consideraciones hechas entonces son aplicables ahora.

Figura IV.11 muestra el efecto de concentraciones crecientes de etanol sobre la fijación de ^3H anisomicina a ribosomas 80S de levadura en condiciones iónicas standard (BFY). No parece existir ningún efecto hasta aquellas concentraciones que producen precipitación del material ribosómico. A partir de entonces hay una suave, pero constante disminución de la afinidad. Tras este ensayo previo se pasó al estudio cuantitativo. Lógicamente, las condiciones iónicas fueron las correspondientes al ensayo de la reacción del fragmento (II.3.9): TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 20 mM, cloruro potásico 400 mM y etanol 33% (v/v). Para un intervalo de concentraciones entre 10^{-7} y 10^{-6} M de ^3H anisomicina se empleó 2×10^{-6} M de ribosomas, mientras que una concentración dos veces superior fué necesaria cuando el antibiótico tritiado se encontró entre 10^{-6} y 10^{-5} M. 6×10^{-6} M fué la concentración ribosómica en aquellos tubos cuyo contenido en ^3H anisomicina era superior a 10^{-5} M. El método empleado fué el de precipitación por etanol (II.3.12) y la temperatura del proceso 0°C . El resultado aparece en la figura IV.12 según una representación de Scatchard. Tan solo fué posible detectar una fijación de caracter homogéneo, que dados los valores de saturación $n = 0,41$ resulta lógico suponer que en presencia de etanol aquellos ribosomas de baja afinidad, o han perdido toda capacidad de interaccionar con anisomicina, o bien esta es tan pequeña que no puede ser detectada por los métodos clásicos de fijación. Mientras tanto, aquellos otros de alta afinidad, a pesar de verla reducida considera-

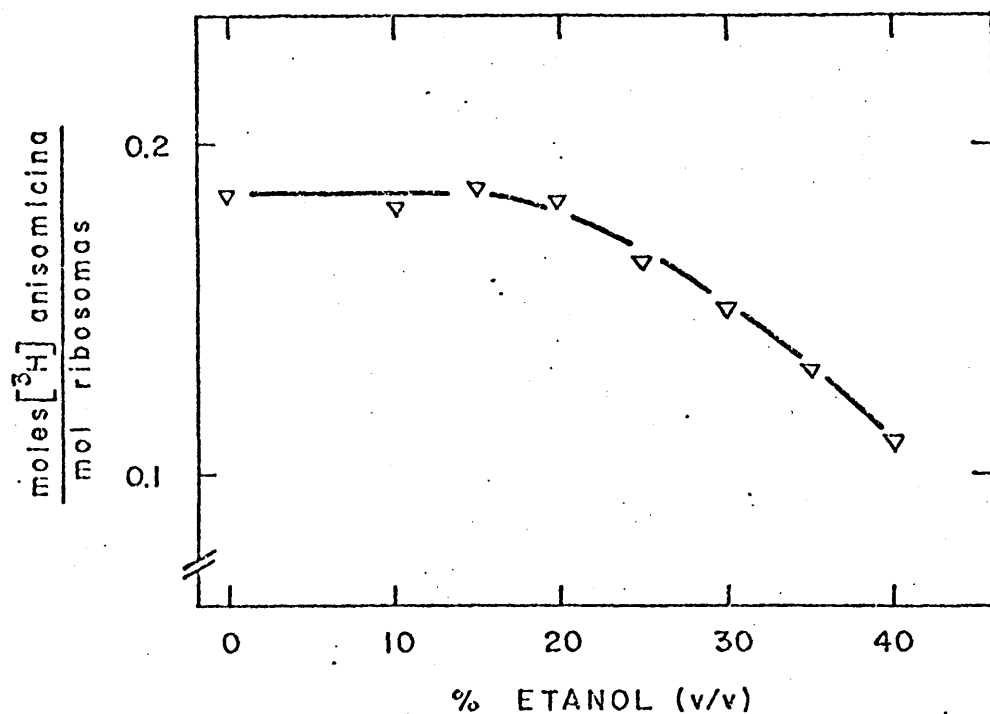


FIG.IV.11. Fijación de ^3H anisomicina a ribosomas de *S.cerevisiae*. Efecto de etanol.

Condiciones iónicas, BFY, temperatura 0°C , experimento de centrifugación. ^3H anisomicina estuvo siempre presente a una concentración final de 10^{-6} M y los ribosomas $2,5 \times 10^{-6}\text{ M}$.

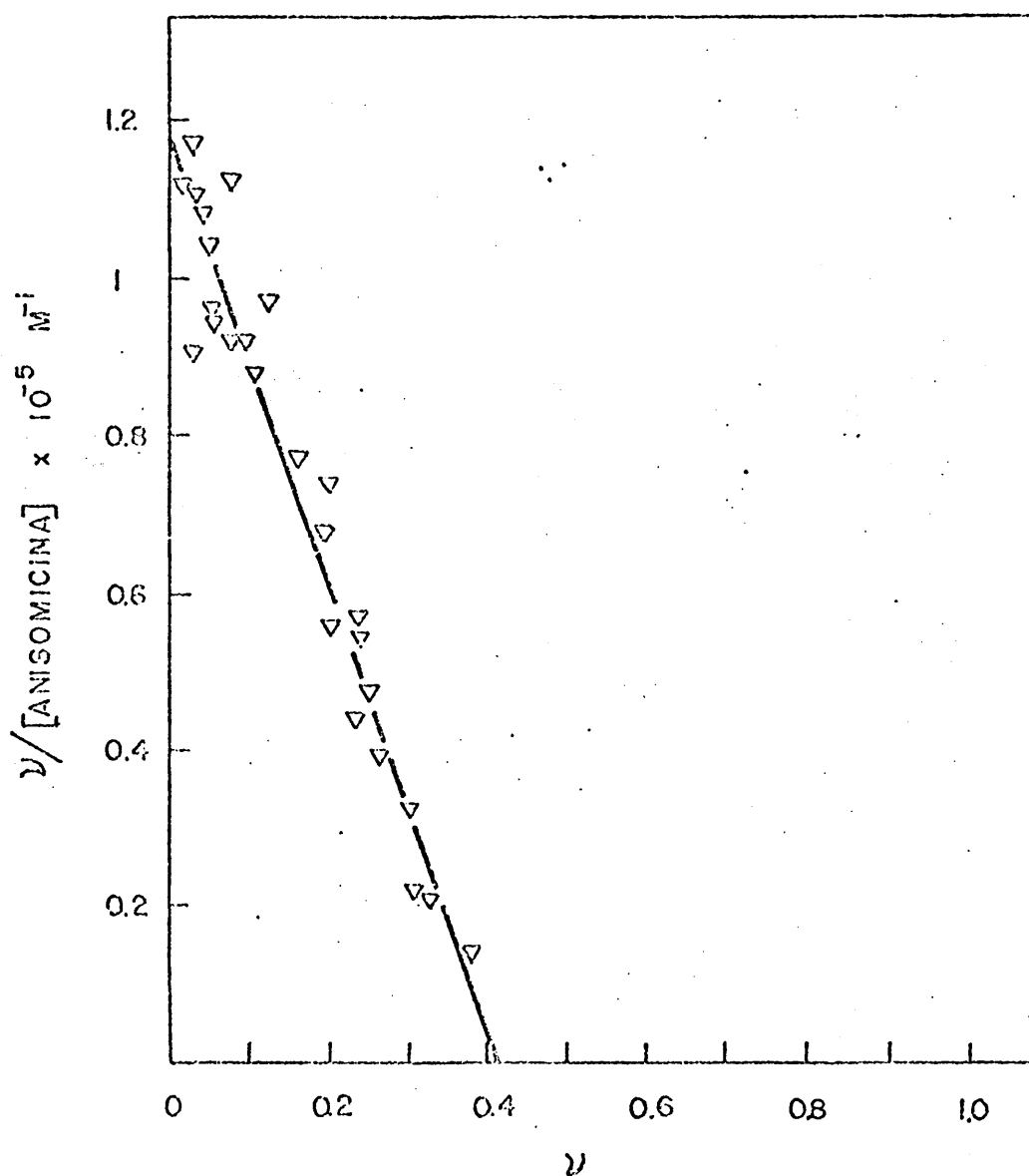


FIG. IV.12. Interacción de 3H anisomicina con ribosomas 80S de *S. cerevisiae* en las condiciones de la reacción del fragmento. Representación de Scatchard.

Cond. experimentales: $0^{\circ}C$, FRY y sedimentación por etanol. Concentración de 3H anisomicina como en la Figura IV.3. Concentraciones de ribosomas $2, 4$ y $6 \times 10^{-6} M$ respectivamente.

blemente $K_d^{\text{EtOH}} = 3,6 \times 10^{-6} \text{ M}$, son los responsables de la fijación detectada en esta experiencia.

El incremento en el porcentaje de los ribosomas "activos" en esta interacción puede ser debido a la presencia del solvente orgánico. Sin embargo no debe descartarse la posibilidad de interconversión de ambos tipos de ribosomas. Desgraciadamente esto solo podría ser demostrado si fuésemos capaces de separarlos físicamente.

El problema de la correlación entre fijación y actividad ha quedado en esta ocasión muy simplificado. En la figura IV.13 la línea continua representa la curva de inhibición teórica calculada según se describió en el apartado anterior. El ensayo necesario para obtener la correspondiente curva experimental fué realizado según se describió en la sección de Métodos Analíticos. La incubación a 0°C fué iniciada por la adición de etanol (33% v/v) y terminada 20 minutos después mediante reducción del pH a 5,5 por sulfato de berilio 0,1 M (saturado con sulfato magnésico). Previamente se había comprobado, de acuerdo a los resultados obtenidos por Battaner (1971) que durante este tiempo, la velocidad de reacción permanecía lineal. En este caso no fué necesario hacer los controles sin puromicina para cada concentración de anisomicina pues no se observó el fenómeno descrito en el apartado anterior debido, siempre siguiendo un paralelismo con los resultados de Caskey y cols. (1971), a que en presencia de etanol no se libera, N-Ac ^3H leucina sino que se forma el etil ester (cuya síntesis es

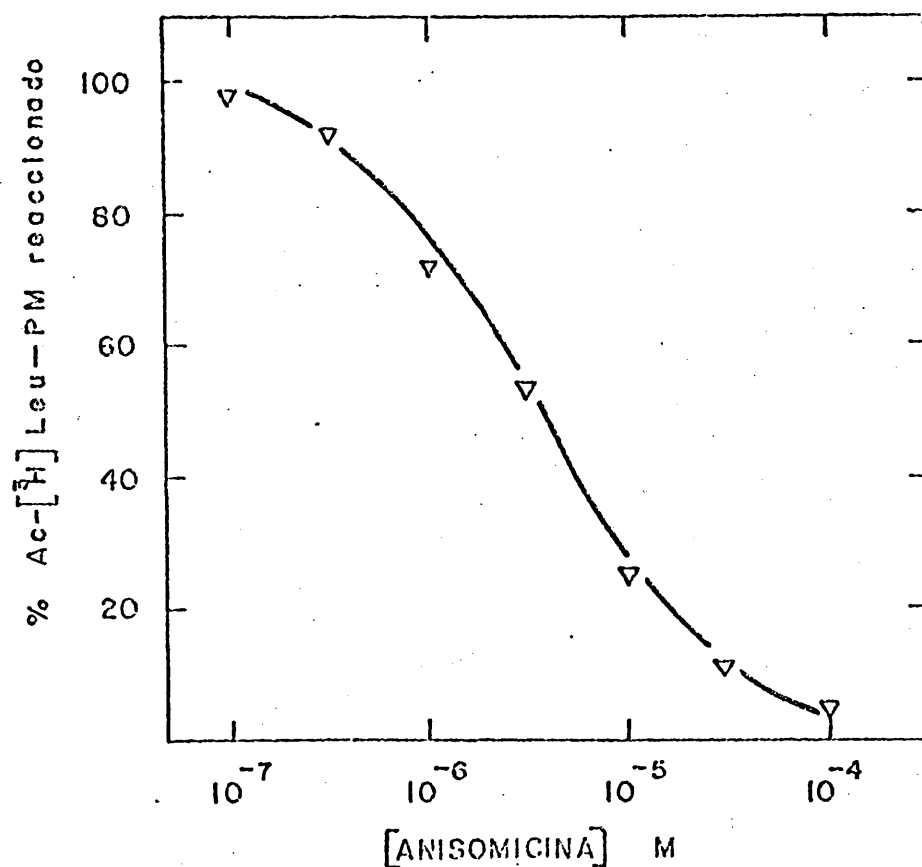


FIG. IV.13. Inhibición por anisomicina de la reacción del fragmento catalizada por ribosomas de *S. cerevisiae*.

(▽) Resultado experimental (en % de reacción) para cada concentración de antibiótico.

— Curva teórica de inhibición según K_d^{EtOH}

Incubación 20 minutos a 0°C. Otras condiciones según II.3.9.

inhibida por anisomicina) siguiendo un mecanismo idéntico a la reacción con puromicina si bien en una proporción auténticamente despreciable en las condiciones del ensayo.

El resultado aparece expresado en la figura IV.13 por los triangulos invertidos. Su perfecta interpolación en la curva teórica no requiere mas comentarios.

El hecho de que en estas condiciones, 33% de etanol (v/v) y especialmente 0°C de temperatura, no se haya producido ninguna disminución de la curva experimental a altas concentraciones del antibiótico, favorece la hipótesis hecha en el apartado anterior basada en consideraciones estadísticas.

Concluyendo, solo aquellos ribosomas (como máximo) capaces de fijar anisomicina con una afinidad definida por K_d^{EtOH} poseen actividad peptidil transferasa ensayada según la reacción del fragmento. La posibilidad de que algunos ribosomas de aquellos que no fijan anisomicina (o lo hacen con K_d superiores a 10^{-4} M) posean actividad peptidil transferasa es mucho mas reducida que utilizando el ensayo de reacción de la puromicina (ver apartado anterior).

IV.1.7. FIJACION A RIBOSOMAS CITOPLASMATICOS HUMANOS.

Si bien para el trabajo desarrollado en esta Tesis se han utilizado preferentemente ribosomas de levadura dado el mayor rendimiento en sus obtenciones, se pretendió generalizar los resultados a otros tipos de ribosomas eucarióticos y ninguno mejor que los extraídos de amígdalas palatinas

humanas, es decir procedentes del extremo opuesto a las levaduras en la escala filogenética.

No ha sido en ningún momento nuestro propósito repetir los experimentos realizados con ribosomas de S.cerevisiae sino encontrar una situación similar en las condiciones mas generales de estudio. Por ello se decidió realizar un experimento de fijación a 0°C y en las condiciones iónicas standard empleadas en el sistema de síntesis de polifenilalanina, esto es BFH: TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 11 mM, cloruro potásico 60 mM y 2-mercaptoetanol 7 mM. La técnica fué la de ultracentrifugación y las cantidades de ribosomas empleadas $2,2 \times 10^{-6}$ M para el rango de ^3H anisomicina 10^{-7} - 10^{-6} M, 4×10^{-6} M para el intervalo 10^{-6} - 10^{-5} M y finalmente 6×10^{-6} M para concentraciones superiores a 10^{-5} del antibiótico tritiado.

Expresando los resultados obtenidos según la representación gráfica de Scatchard (Fig. IV.14) se observa una situación similar a la obtenida con levaduras, aunque existen ciertas diferencias en cuanto a las proporciones de ambos tipos de ribosomas. Los de alta afinidad, $K_{d1}^{\text{HT}} = 1,6 \times 10^{-6}$ M representan un 37% del total y los de baja afinidad $K_{d2}^{\text{HT}} = 6,6 \times 10^{-6}$ M son un 35%. Así nos encontramos en este caso con cantidades idénticas de ambos, mientras que en levadura (en estas mismas condiciones) la proporción de los ribosomas definidos por $K_{d2}^{0^\circ\text{C}}$ era exactamente el doble. La significación de estos resultados es todavía desconocida. Sin embargo ha quedado demostrada la generalidad del fenómeno de heterogeneidad de los ribosomas eucarióticos en

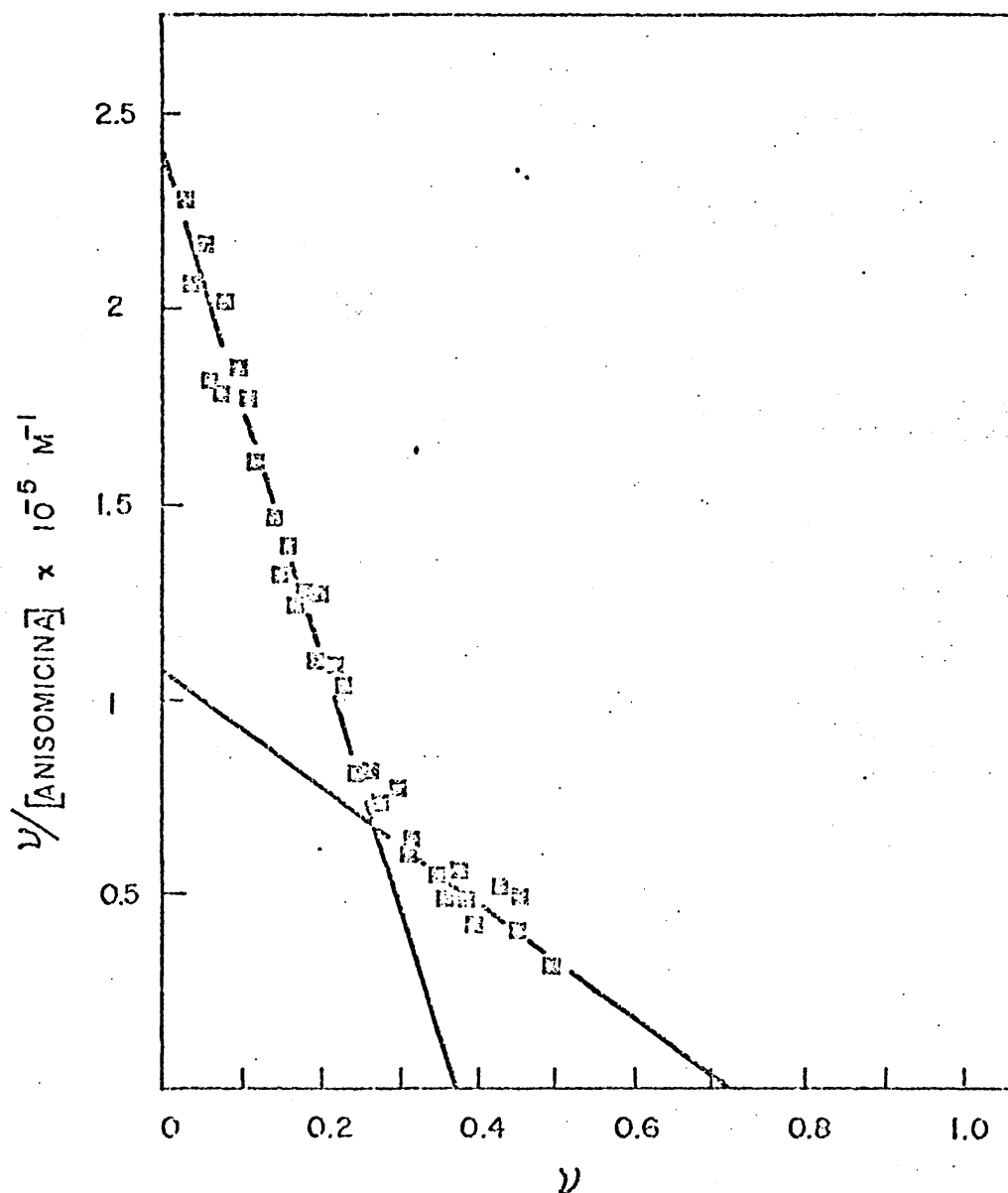


FIG.IV.14. Interacción de 3H anisomicina con ribosomas 80S procedentes de amígdalas palatinas humanas.

Cond.experimentales: BFH, $0^{\circ}C$, ultracentrifugación 2,2; 4_3 y $6 \times 10^{-6} M$ de ribosomas para los rangos de 3H anisomicina, 10^{-7} - $10^{-6} M$, 10^{-6} - $10^{-5} M$ y $> 10^{-5} M$ respectivamente. Representación de Scatchard.

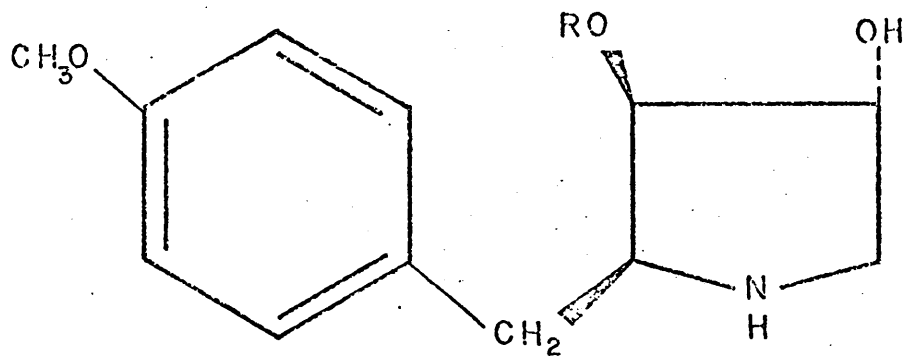
cuanto a su afinidad por anisomicina.

IV.1.8. ESPECIFICIDAD ESTRUCTURAL DE LA INTERACCION DE ^3H ANISOMICINA CON RIBOSOMAS EUCARIOTICOS DE LEVADURA

Había sido descrito por Grollman en 1967 que desacetilanisomicina (2-p metoxifenilmetil-3,4-dihidroxipirrolidina) (Fig. IV.15) era inactiva en sistemas acelulares de levadura o reticulocitos. En este apartado se ha tratado de investigar las razones de esta pérdida de actividad. El punto de atención ha sido comprobar si desacetilanisomicina era capaz de interaccionar con el ribosoma ó no, dicho en otras palabras, si el grupo acetato eliminado formaba parte de los requerimientos estructurales de la molécula de anisomicina para interaccionar en un sitio específico del ribosoma o estaba implicado en su afinidad. Los motivos que nos indujeron a realizar este estudio son comentados en la Discusión.

Si la segunda hipótesis era la correcta habríamos de encontrar un comportamiento idéntico entre anisomicina y su derivado desacetilado en cuanto a inhibición de los sistemas acelulares ensayados si bien las concentraciones necesarias para producir un determinado porcentaje de inhibición serían mucho mas favorables al antibiótico intacto.

La figura IV.16 muestra el efecto comparativo de ambas sustancias sobre A, síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico y B, reacción del fragmento. Según el ensayo de síntesis de polifenilalanina la diferencia entre



$\text{R} = \text{CH}_3 \text{ CO}$ ANISOMICINA

$\text{R} = \text{H}$ DESACETILANISOMICINA

FIG.IV.15. Estructura de anisomicina y su derivado desacetilado.

Según Butler (1968)

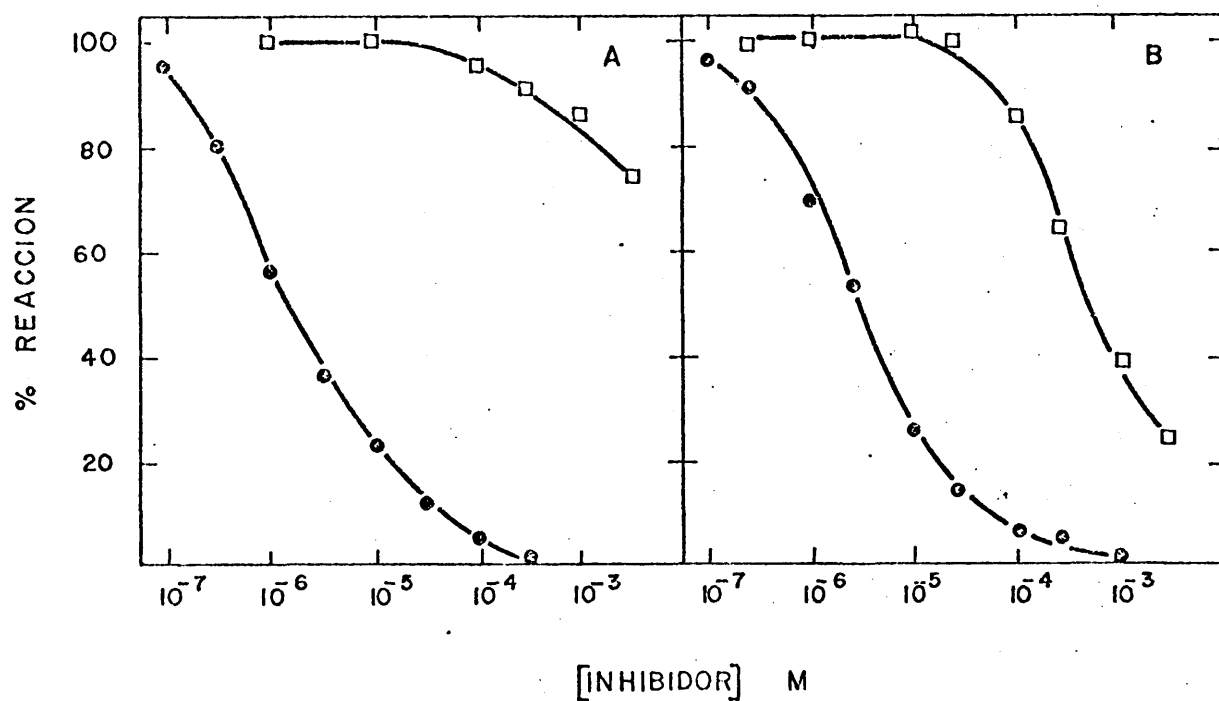


FIG.IV.16. Efecto de anisomicina y desacetilanisomicina en:

A. Síntesis de polifenilalanina

B. Reacción del fragmento

●—● anisomicina

□---□ desacetilanisomicina

Sistemas de *S.cerevisiae*, II.3.7 y II.3.9 respectivamente.

ambos compuestos es abismal, puesto que incluso puede considerarse que desacetilanisomicina no posee efecto alguno. Sin embargo en la reacción del fragmento se comportan paralelamente, si bien para concentraciones iguales, el efecto de anisomicina es 300-350 veces superior. Según estos resultados parecería confirmarse cada una de las hipótesis que se dibujaron anteriormente, dependiendo de la presencia de etanol. Es bien conocido que el sistema de polifenilalanina presenta unas particularidades tan especiales que antibióticos como cloranfenicol o eritromicina se muestran como mal y nulo inhibidor respectivamente. Esta incógnita podía desvelarse estudiando la reacción de la puromicina, sin embargo preferimos utilizar un método mas directo, esto es, el efecto de desacetilanisomicina sobre la fijación de ^3H anisomicina a ribosomas.

La figura IV.17 muestra en una primera aproximación un experimento cualitativo. Dado que el antibiótico tritiado se encuentra a una concentración de 10^{-6} M podemos observar que aun en ausencia de etanol (este experimento se realizó en condiciones standard, BFY) desacetilanisomicina tiene un efecto directo y proporcional sobre la fijación de ^3H anisomicina. Este experimento demuestra tanto la artificialidad del sistema de poli U para desacetilanisomicina como la capacidad de ésta para interaccionar con el ribosoma eucariótico.

La hipótesis sostenida en un principio, de que el grupo acetato es responsable de la afinidad de anisomicina por

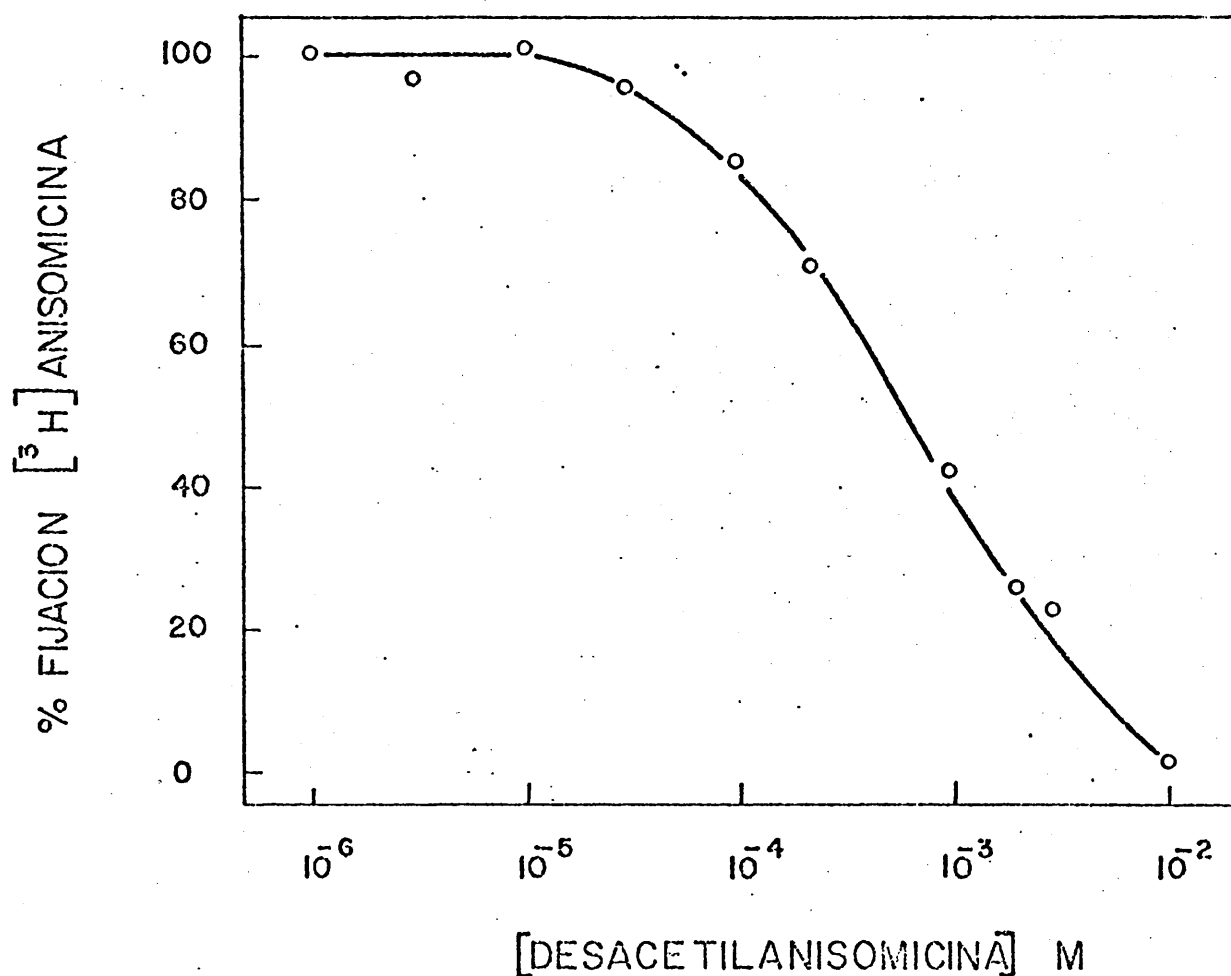


FIG.IV.17. Efecto de desacetilanisomicina sobre la interacción de ^3H anisomicina con ribosomas 80S de *S. cerevisiae*.

Cond.Experimentales: 10^{-6} M de ^3H anisomicina y $2,5 \times 10^{-6}$ M de ribosomas. 0°C , BFY y ultracentrifugación.

el ribosoma pero no interviene en la estructura necesaria para el reconocimiento por el antibiótico de su "sitio de fijación" solo puede ser demostrado si desacetilanisomicina es un inhibidor competitivo de la fijación de anisomicina.

Para ello se realizó el correspondiente experimento tal y como se describió en los apartados II.3.14 y III.3.3. El resultado aparece en la figura IV.18. Las rectas en ausencia o presencia de desacetilanisomicina se cortan en un mismo punto del eje de ordenadas. Esto, como es generalmente sabido, significa competitividad entre la fijación de ^3H anisomicina y su derivado desacetilado. La concordancia entre el valor de la constante de disociación obtenido a partir de las curvas correspondientes a 0,3 mM (Δ — Δ) y a 0,8 mM de desacetilanisomicina, esto es $K_d(\text{DAN}) = 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$, confirmó la validez del experimento. Este valor es 350 veces superior al obtenido en el control de ^3H anisomicina ($K_d(\text{ANIS}) = 4,2 \times 10^{-7} \text{ M}$).

Las condiciones experimentales fueron las descritas en IV.1.3 a excepción de que tan solo se emplearon ribosomas a una concentración final de $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ para un rango de ^3H anisomicina $0,5$ – $5 \times 10^{-6} \text{ M}$.

A la vista de estos resultados se puede concluir que el grupo hidroxido situado en el carbono 3' del anillo pirrolidínico es responsable de la elevada afinidad de anisomicina por el ribosoma pero no forma parte de la estructura requerida por el antibiótico para reconocer su sitio de fijación en

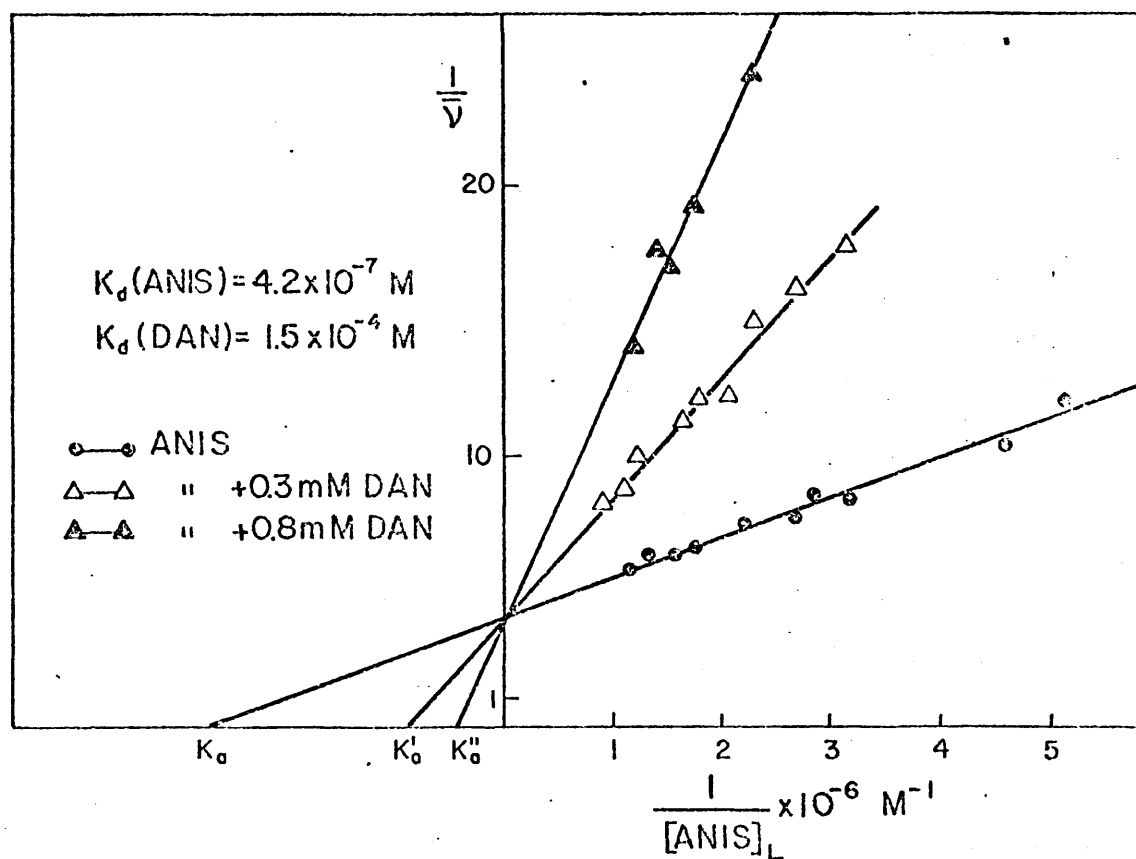


FIG.IV.18. Cálculo de la afinidad de desacetilanisomicina por el ribosoma 80S de *S.cerevisiae*. Medida indirecta a partir de su efecto sobre la fijación de ^3H anisomicina. Representación doble recíproca.

○—○ ^3H anisomicina $0,5 - 5 \times 10^{-6} \text{ M}$
 △—△ Idem + desacetilanisomicina $3 \times 10^{-4} \text{ M}$
 ▲—▲ Idem, $8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Ribosomas $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$, 0°C , BFY y ultracentrifugación fueron las restantes condiciones.

el ribosoma.

Finalmente la correlación obtenida entre los valores de las constantes de disociación (en condiciones iónicas standard) y el resultado en la inhibición de la reacción del fragmento hacen suponer que la presencia de etanol no altera sustancialmente estas conclusiones.

IV.1.9. FIJACION DE ^3H ANISOMICINA A RIBOSOMAS DE LEVADURA EN PRESENCIA DE ACETONA

La inclusión de este apartado requiere una pequeña introducción. Caskey y colaboradores han desarrollado unos sistemas acelulares para estudiar el proceso de terminación separado de las otras etapas de síntesis de proteínas. Para ello utiliza ribosomas, AUG (triplete iniciador) y f-Met-tRNA_F (aminoacil-tRNA iniciador). Forma un complejo ternario que si bien corresponde a una etapa de iniciación no es menos cierto que asemeja la situación que ha de tener un ribosoma en un estado de terminación substituyendo el peptidil-tRNA por formil-metionil tRNA_F y el triplete terminador (ej: UAA) por la ausencia de triplete.

A partir de este complejo puede estudiarse tres tipos de reacciones:

a) en presencia de puromicina, ocurre la síntesis de enlace peptídico o reacción de la puromicina, interviniendo el centro activo peptidil transferasa.

b) en presencia de etanol, se forma el etil ester de formilmetionina siendo así mismo responsables de este proceso peptidil transferasa. Ambas a) y b) son inhibidas por todas aquellas sustancias capaces de inhibir enlace peptídico.

c) Caskey observó que en presencia de acetona (30% v/v) ocurría una liberación de formil-metionina, dependiente de la adición de tRNA deacilado. (En realidad la reacción se corresponde con la estimulación producida por tRNA puesto que en su ausencia tiene lugar una considerable hidrólisis de formil-metionina). Con objeto de comprobar si intervenía peptidil transferasa en el proceso terminación tal y como habían sugerido otros autores (Vogel, Zamir y Elson, 1969), estudió el efecto de los inhibidores de este centro activo en esta reacción. Sorprendentemente encontró que mientras todos inhibían, anisomicina (y lincomicina en el caso de ribosomas procarióticos) estimulaba esta hidrólisis.

Ante la imposibilidad de explicar este resultado con los conocimientos actuales acerca del mecanismo de acción de anisomicina se pensó en estudiar su interacción con el ribosoma en presencia de acetona, incluso en las mismas condiciones iónicas a las descritas por Caskey para su sistema de reticulocitos: TRIS ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 11 mM, cloruro potásico 50 mM así como la temperatura de 24°C.

Los resultados aparecen en la tabla IV.2, mostrándose una disminución de afinidad que no puede en absoluto explicar el diferencial comportamiento del antibiótico. Análo-

TABLA IV.2

FIJACION DE ^3H ANISOMICINA A RIBOSOMAS

EFFECTO DE ACETONA

| Sistema | pmoles de ^3H anisomicina fijados |
|----------------|---|
| Completo | 36,5 |
| + Acetona 0°C | 4,8 |
| Completo | 31,4 |
| + Acetona 24°C | 10,4 |

Experimento de ultracentrifugación en las condiciones iónicas descritas en IV.1.9 (Caskey y cols. 1971). Cuando acetona estuvo presente (30%, v/v) la centrifugación se realizó en centrifuga de mesa durante 15 minutos (max.velocidad) en viales cerrados hermeticamente. ^3H anisomicina 10^{-6} M. Ribosomas 80S de S.cerevisiae $3,5 \times 10^{-6}$ M.

go resultado negativo se obtuvo cuando se caracterizó, tanto el producto libre en el sobrenadante, como el unido a los ribosomas en el sedimento que resultó ser anisomicina sin ningún tipo de modificaciones.

Estos experimentos debido a la evaporización de la acetona se realizaron en viales 1-1,5 ml de capacidad hermeticamente cerrados. La centrifugación se hizo durante 15 minutos en una centrifugación de mesa a la máxima velocidad (alrededor de 4.000 rpm) a temperatura ambiente. Previamente los viales habían sido incubados 5 minutos a 24°C. También se realizó esta experiencia a 0°C (Tabla IV.2).

IV.2. FIJACION DE ^3H GOUGEROTINA A RIBOSOMAS

IV.2.1. ESPECIFICIDAD DE LA INTERACCION DE ^3H GOUGEROTINA CON RIBOSOMAS.

Al igual que sucedió con ^3H anisomicina, el primer paso al estudiar la interacción de un antibiótico con ribosomas es demostrar que esta es específica, esto es, que solo ocurre con aquellas estructuras responsables de la función inhibida por el antibiótico.

Inicialmente gougerotina debe fijarse a ribosomas procarióticos y eucarióticos puesto que es activa en ambos sistemas y consecuentemente, a la subunidad mayor 50S ó 60S, respectivamente, puesto que inhibe formación de enlace peptídico.

Estos resultados aparecen confirmados en el experimento de sedimentación descrito en la Tabla IV.3. Sin embargo es remarcable la diferencia existente entre el ribosoma y su subunidad. Este tema se tratará en esta sección mas adelante.

Las soluciones iónicas empleadas fueron BFY en el caso de levaduras, BFH en el de amígdalas palatinas humanas y BFB en el de bacterias. El resto de las condiciones fué: concentración 3×10^{-6} M ribosomas 80S de levadura y sus correspondientes subunidades y $2,5 \times 10^{-6}$ M para los procarióticos, mientras que los ribosomas humanos se emplearon a una concentración final de $3,5 \times 10^{-6}$ M. ^3H gou-

TABLA IV.3

ESPECIFICIDAD DE LA FIJACION DE ^3H GOUGEROTINA A RIBOSOMAS Y SUS SUBUNIDADES

| Preparación ribosómica | Fuente de obtención | mmoles de ^3H gougerotina unidos por mol de ribosomas |
|---------------------------|--------------------------------|---|
| Ribosomas 70S | <u>E.coli</u> | 171 |
| Ribosomas 80S | <u>S.cerevisiae</u> | 76 |
| Ribosomas 80S | Amígdalas palatinas humanas | 45 |
| Subunidad 50S | <u>E.coli</u> | 28 |
| Subunidad 30S | <u>E.coli</u> | 0 |
| Subunidad 60S | <u>S.cerevisiae</u> | 12 |
| Subunidad 40S | <u>S.cerevisiae</u> | 0 |

El experimento ha sido llevado a cabo por el método de ultracentrifugación. En todos los casos la concentración de ribosomas o subunidades fué de 3×10^{-6} M y 10^{-6} M la de ^3H gougerotina. Las condiciones iónicas fueron las correspondientes a cada sistema.

gerotina estuvo siempre presente a 10^{-6} M.

IV.2.2. EFECTO DE SALES Y ETANOL

a) Efecto de sales. Este estudio fué realizado tan solo con ribosomas 80S de levadura S.cerevisiae, debido a que en el caso de E.coli se adoptaron desde un principio las condiciones iónicas empleadas por Fernández-Muñoz y cols. (1971) al estudiar la fijación de cloranfenicol, lincomicina y eritromicina al ribosoma 70S, con objeto de dar un valor comparativo y uniforme a los resultados aquí descritos. Al igual que ocurrió en el caso de anisomicina, las variaciones son mínimas y además ocurren en un sentido totalmente paralelo (Fig. IV.19). Dado que ambos antibióticos interaccionan con el ribosoma en sitios totalmente independientes (Capítulo V) esta propiedad de inalterabilidad ante las concentraciones de magnesio y amonio (ó potasio) empleadas, parece ser un rasgo característico de todo el centro peptidil transferasa mas que de los propios sitios de fijación de los antibióticos.

b) Efecto de etanol. Se ha estudiado en las condiciones iónicas de la reacción del fragmento. Esto es FRY, TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 20 mM y cloruro potásico 400 mM para ribosomas eucarióticos y BFB, TRIS-ClH (pH 7,4) 33 mM, cloruro magnésico 13 mM y cloruro potásico 270 mM para ribosomas y subunidades procarionóticas. El resto de las condiciones experimentales aparecen descritas en el correspondiente apartado de Métodos

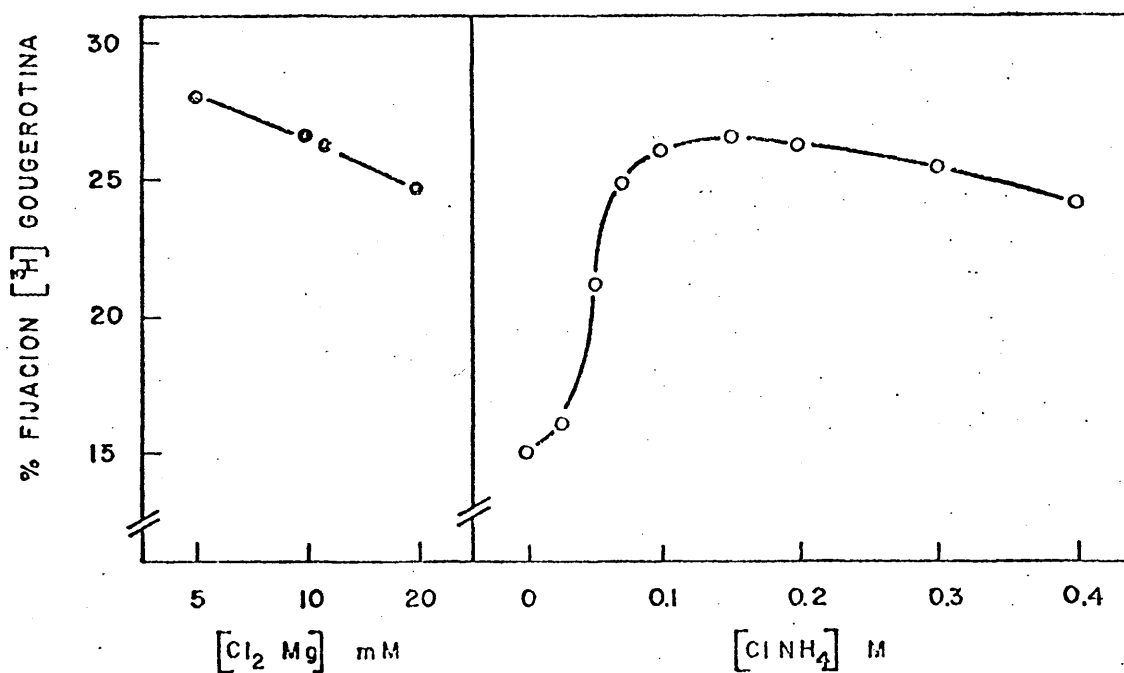


FIG.IV.19. Fijación de ³H gougerotina a ribosomas de S. cerevisiae

●—● Efecto de magnesio

Otras condiciones: Maleato amónico (pH 6,5)
50 mM, 0°C.

○—○ Efecto de amonio

Otras condiciones: TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM,
Cl₂Mg 12 mM, 0°C. Experimento de ultracentrifugación. $3,5 \times 10^{-6}$ M de ribosomas y 10^{-6} M de ³H gougerotina.

(II.3.13).

Al igual que sucedió en el caso de anisomicina, concentraciones de etanol inferiores al 20% (v/v), es decir aquellas que no provocan precipitación del ribosoma, no afectan sustancialmente la afinidad de gougerotina por el ribosoma eucariótico. Sin embargo al sobrepasar este punto crítico de precipitación se produce un dramático descenso de afinidad hasta un 35% (v/v) para luego seguir disminuyendo mas lentamente.

Uniendo este resultado (Fig. IV.20A) al obtenido estudiando el efecto de cationes podemos deducir que la diferencia de afinidad de gougerotina en las condiciones standard (BFY) y la de reacción del fragmento (FRY) son de 5 veces a favor de las primeras, suponiendo que se mantengan aproximadamente constantes los valores de saturación.

Una situación paralela se presenta en ribosomas procarióticos (Fig. IV.20B). A partir de 10% (v/v) (Obsérvese que en este caso la caída comienza antes de las condiciones de precipitación) existe una disminución lineal en la afinidad hasta llegar a valores del 30-35% (v/v) donde si bien sigue decreciendo lo hace mas lentamente tal y como sucedió en ribosomas 80S. Dado que las condiciones iónicas empleadas son idénticas para experimentos standard o de "reacción de fragmento", las diferencias encontradas entre ambos deben ser atribuidas única y exclusivamente a la presencia del etanol. El valor cuantitativo deducido de este experimento fué de 3,6 veces a favor del sistema standard.

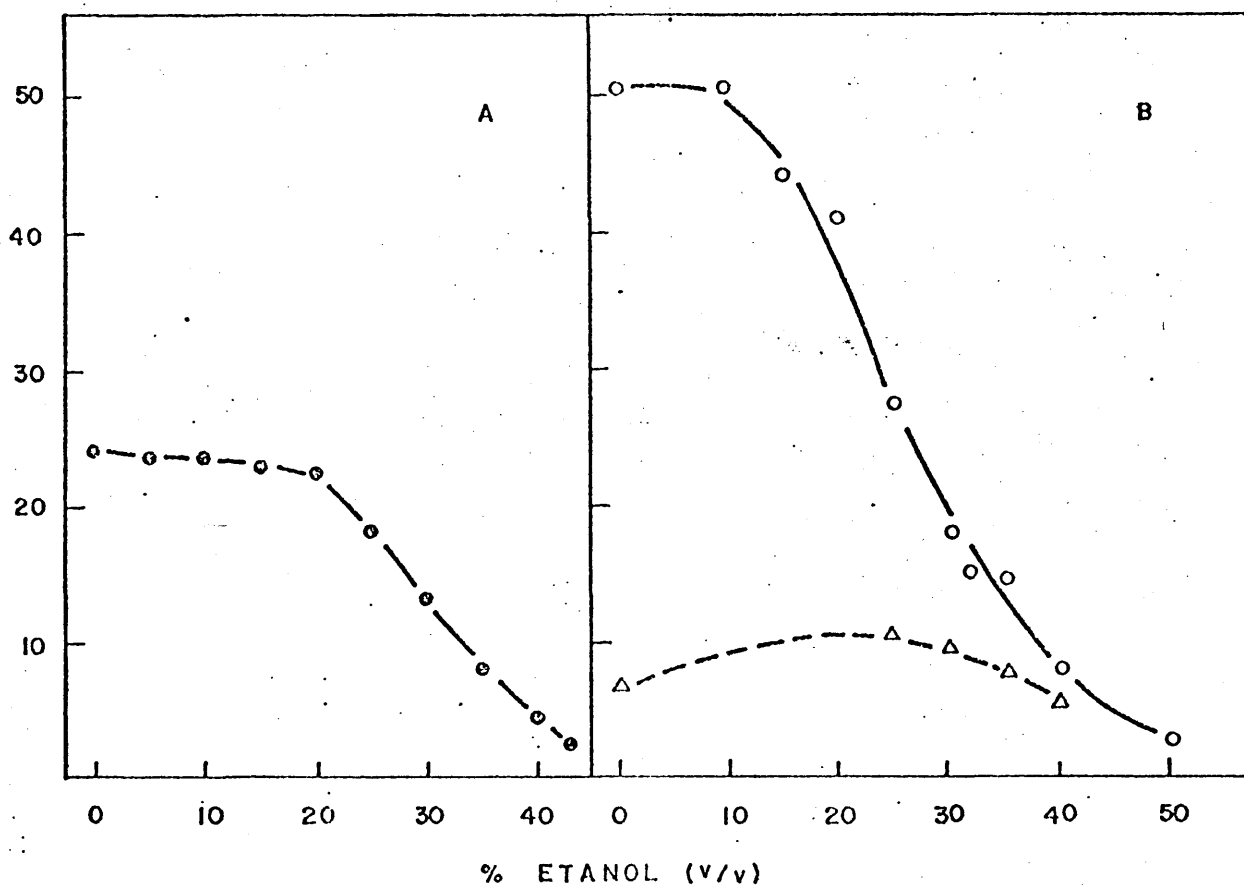


FIG.IV.20. Efecto de etanol sobre la fijación de ^3H gerotina a:

- Ribosomas 80S de *S.cerevisiae*
- Ribosomas 70S de *E.coli*
- Δ---Δ Subunidades 50S de *E.coli*

Las condiciones iónicas empleadas han sido A.- FRY y B.- BFB a las que se han añadido las cantidades requeridas de etanol.

Estos valores aquí obtenidos seran correlacionados posteriormente con estudios de actividad de formación de enlace peptídico.

El efecto que el etanol, y en general otros solventes orgánicos tales como metanol, acetona etc., producen en la estructura ribosómica es desconocido en su esencia, aunque hayan sido empleados para estudiar reacciones parciales de la compleja maquinaria de la síntesis de proteínas, que sin su presencia no hubiera sido posible llevarlas a cabo. Así la reacción del fragmento, donde ha sido eliminada la función del RNA mensajero así como del tRNA a excepción del trinucleótido 3' terminal CCA (común para todas las especies), requiere la presencia de alcoholes primarios de cadena corta (Monro, 1967). Acetona es imprescindible para la hidrólisis de f-Met-tRNA en el sistema descrito por Caskey y cols. (1971) (ver IV.1.9). Así mismo Ballesta y Vázquez (1972a) han observado que la GTPasa del factor de polimerización EF T ($T_u + T_s$) tiene lugar en presencia de 20% de metanol, aún en ausencia de aminoacil-tRNA, siendo esta hidrólisis de GTP resistente a tiostreptón, un antibiótico que la inhibe cuando esta tiene lugar a partir del complejo ternario GTP-EF T_u -aminoacil-tRNA. En todos estos sistemas se ha encontrado que la subunidad 50S (cuando podía actuar por si sola) se comportaba de la misma forma que el ribosoma completo, es decir la respuesta al solvente orgánico ocurría en una estructura de esta subunidad, independientemente de que la presencia de la subunidad.

menor tuviera o no influencia (Berman y Monier, 1971).

Sin embargo nos encontramos que al estudiar la fijación de ^3H gougerotina a la subunidad 50S de *E. coli*, independientemente de la baja afinidad encontrada en ausencia de etanol (este tema se tratará en IV.2.4), vemos que el efecto de este solvente es prácticamente nulo (incluso a concentraciones del 25% (v/v) existe un incremento en la fijación del 50%). Al igual que en los casos anteriores no estamos capacitados para explicar el efecto del etanol en la estructura de la subunidad 50S, sin embargo no es aventurado suponer que esta subunidad posea dos conformaciones distintas, una aislada y otra formando el ribosoma 70S. En esta última el sitio de fijación de gougerotina se ve favorecido por una determinada estructura que al ir variando a consecuencia de la presencia de etanol va ejerciendo un efecto negativo sobre la afinidad de antibiótico. Mientras tanto la subunidad 50S aislada ha perdido, al separarse de la subunidad 30S, esta conformación favorable y así, el etanol, si bien tendrá su efecto directo sobre la estructura total de la subunidad, no ejerce su acción inhibitoria sobre la interacción de gougerotina con el ribosoma.

Finalmente la subunidad menor 30S no es capaz de interaccionar con ^3H gougerotina independientemente de la concentración de etanol empleada (Fig. IV.20B).

IV.2.3. INTERACCION DE ^3H GOUGEROTINA CON RIBOSOMAS.

Mediante un experimento clásico de ultracentrifugación

se estudió de forma cuantitativa la interacción de gougerotina con el ribosoma eucariótico de levadura.

Las condiciones experimentales fueron: Maleato amónico (pH 6,5) 50 mM, cloruro magnésico 12 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM (es decir BFY), ribosomas 2,5, 4 y 6 $\times 10^{-6}$ M para los intervalos de concentración de antibiótico 10^{-7} - 10^{-6} M, 10^{-6} - 10^{-5} M y 10^{-5} - 8×10^{-5} M respectivamente, siendo 0°C la temperatura a la que se realizó la experiencia. Volúmenes finales y alicuotas para estimación de radioactividad como en IV.1.3.

Los resultados, porcesados de acuerdo a Scatchard (1949), aparecen en la figura IV.21A. De nuevo nos encontramos con la situación de heterogeneidad ampliamente comentada para anisomicina. Si bien pudiera tratarse de un fenómeno casual no deja de ser sorprendente la coincidencia entre la proporción de ambos tipos de ribosomas entre estos dos antibióticos. La afinidad principal $K_{d1}^{80S} = 9,1 \times 10^{-7}$ M corresponde a un 29% del total de ribosomas (28% en el caso de $K_{d1}^{0°C}$ (ANIS) mientras que la fijación secundaria o de baja afinidad $K_{d2}^{80S} = 1,2 \times 10^{-5}$ M parece ser responsable de un 55% (56% para $K_{d2}^{0°C}$ (ANIS)).

Tal y como se esbozó en el estudio del efecto de cationes sobre la fijación de anisomicina y gougerotina, este nuevo dato aporta evidencia de que la heterogeneidad ribosómica no está localizada en el sitio de fijación del antibiótico, sino en aquella región responsable, al menos, de la actividad peptidil transferasa. El hecho (ver Capítulo V) que

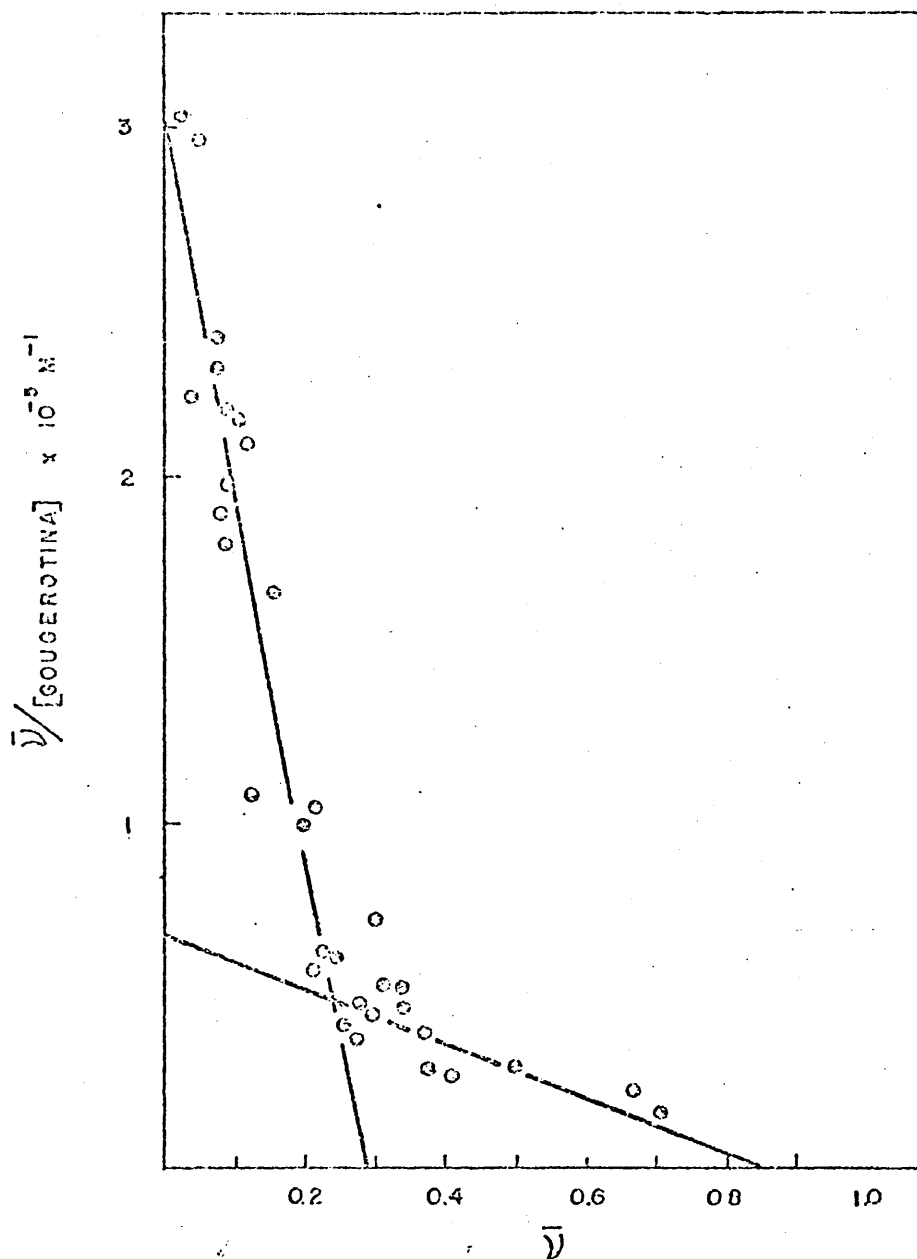


FIG.IV.21A. Interacción de ^3H gougerotina con ribosomas 80S de *S.cerevisiae*. Representación de Scatchard.

Cond.experimentales: 0°C , BFY y ultracentrifugación. 10^{-7} - 10^{-6} M, 10^{-6} - 10^{-5} M y 10^{-5} - 8×10^{-5} M de ^3H gougerotina correspondientes a 2,5; 4 y 6×10^{-6} M de ribosomas eucarióticos.

estos dos inhibidores interaccionen en sitios totalmente independientes del ribosoma de una mayor validez a este aserto.

Gougerotina, dado su caracter de inhibidor común a sistemas procarióticos y eucarióticos (Pestka, 1971; ver Introducción) se presenta como un magnífico instrumento para dilucidar si el carácter heterogéneo de los ribosomas eucarióticos ensayado según su afinidad por antibióticos, es una propiedad de estos, o bien se trata de una característica diferencial entre ribosomas eucarióticos y procarióticos.

El experimento es sencillo, basta estudiar cuantitativamente la fijación de ^3H gougerotina a ribosomas procarióticos tal y como se hizo anteriormente para ribosomas 80S empleando (como uncontrol mas) las mismas condiciones iónicas en las que los ribosomas se encuentran homogéneos fijando cloranfenicol, lincomicina o eritromicina, esto es BFB: TRIS-ClH (pH 7,4) 33 mM, cloruro magnésico 13 mM y cloruro potásico 270 mM. Las concentraciones de ribosomas 70S de *E. coli* fueron entre 4 y $6,5 \times 10^{-6}$ M para los rangos de ^3H gougerotina comprendidos entre $0,4-4 \times 10^{-6}$ M y $0,5-4 \times 10^{-5}$ M respectivamente. Volúmenes finales de 0,08 ml (0,02 ml) y 0,06 ml (0,012 ml) respectivamente. Los valores entre paréntesis corresponden a las alícuotas tomadas antes y después de la centrifugación para estimación de radioactividad. El experimento se realizó a una temperatura de 0°C .

El resultado se encuentra expresado en la figura IV. 21B. La conclusión es inmediata, la heterogeneidad puesta

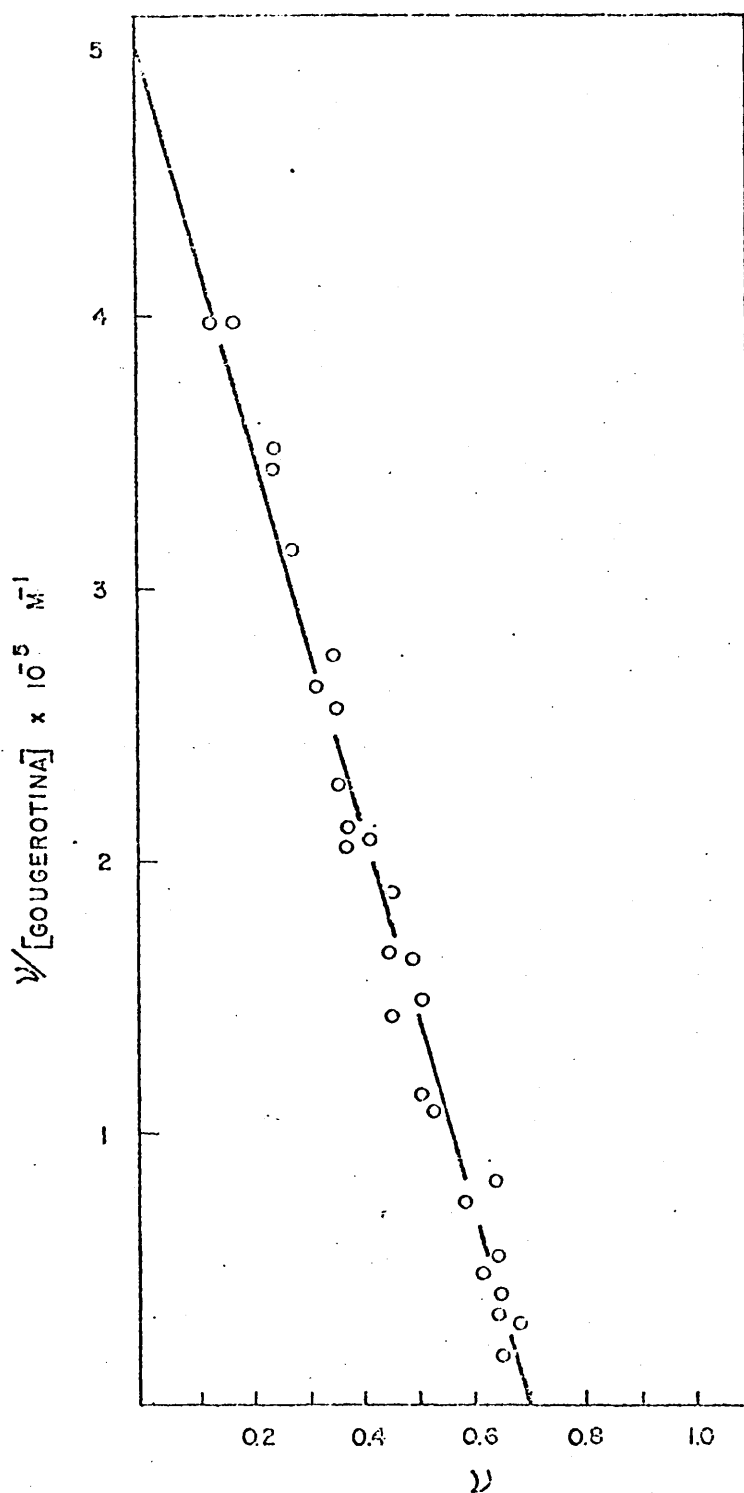


FIG.IV.21B. Interacción de ^3H gougertina con ribosomas 70S de *E. coli*. Representación de Scatchard.

Cond. experimentales: 0°C , BFB y ultracentrifugación: $0,4-4 \times 10^{-6} \text{ M}$ y $0,5-4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ^3H gougertina correspondientes a 4 y $6,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ de ribosomas procarióticos.

de manifiesto en los ribosomas eucarióticos por su interacción con ^3H gougerotina es una propiedad característica suya, puesto que los ribosomas procarióticos interaccionan con este inhibidor de forma totalmente homogénea al igual que sucedía con todos los inhibidores de peptidil transferasa estudiados anteriormente por otros autores. Esta conclusión acerca de los ribosomas 80S puede hacerse extensible a anisomicina.

La afinidad de gougerotina por los ribosomas bacterianos resultó ser $K_d^{70S} = 1,5 \times 10^{-6} \text{ M}$, prácticamente igual a K_{d1}^{80S} . La saturación extrapolada a concentración infinita de gougerotina libre en el equilibrio resultó ser $n = 0,7$. Experimentos realizados por A. Contreras en nuestro laboratorio con este mismo lote de ribosomas dieron idénticos valores de saturación al estudiar la fijación de ^{14}C cloranfenicol y ^{14}C tiamfenicol (Contreras, Barbacid y Vazquez, 1973).

IV.2.4. FIJACION DE ^3H GOUGEROTINA A SUBUNIDADES RIBOSOMICAS.

Ya quedó especificado en la tabla IV.3 la poca afinidad de gougerotina por la subunidad mayor del ribosoma eucariótico. Esto impidió realizar un estudio cuantitativo de fijación, análogo al descrito en IV.1.4. Se trató al menos, de realizar el experimento de reconstitución de subunidades con objeto de comparar estos resultados con los obtenidos en el caso de ^3H anisomicina. Sin embargo la adición de

subunidades 40S en proporciones equimoleculares no produjo ningún incremento en la afinidad por ^3H gougierotina. Gradientes de sacarosa mostraron que ambas subunidades eran capaces de reasociarse dando un producto que sedimentaba como 80S. Estos controles tienen el inconveniente de realizarse en un rango de concentraciones muy inferior al empleado en experimentos de fijación, no obstante el éxito obtenido en los ensayos de reconstitución para anisomicina hacen pensar que este sea un fenómeno particular de gougierotina y no una consecuencia de inactivación de las subunidades ribosómicas.

Ante el paralelismo encontrado con la subunidad 50S (Tabla IV.3) se trató de comprobar si esta "ausencia de reconstitución" en cuanto a afinidad por gougierotina se refiere, era común al ribosoma procariótico. El resultado fué afirmativo pues la adición de cantidades equimoleculares de subunidades 30S produjo un incremento de 6 mmoles de gougierotina por ribosoma lo que frente a los 28 obtenidos con subunidades 50S significa tan solo un aumento del 20%. Dada la mayor facilidad operativa que representa trabajar con material bacteriano se estudió este fenómeno con subunidades de E.coli.

Se enfocó el problema desde un punto de vista de autoincapacidad por parte de las subunidades, para formar ribosomas 70S idénticos a aquellos de los que provenían. Así se pensó que la adición de RNA mensajero (ácido poliuridílico) y (6) de tRNA^{Fen} es decir, tRNA capaz de

ser codificado por este mensajero, permitirían la formación de una partícula 70S de características similares a aquella implicada en el proceso de traducción del mensaje genético y principal componente de la preparación de 70S con lo que se obtuvo el resultado representado en la figura IV.21B al estudiar su interacción con gougerotina.

Dado lo costoso que resulta realizar experimentos cuantitativos (representaciones de Scatchard) para cada una de las situaciones posibles según el anterior esquema de trabajo se han empleado ensayos semicuantitativos, esto es, para una concentración fija de gougerotina (10^{-6} M), concentraciones variables de ribosomas (ó subunidades) de tal forma que se trabaje en la etapa lineal de la curva de saturación.

El resultado (0°C) aparece en la figura IV.22. (X—X) representa la curva de saturación dada por subunidades aisladas. La línea discontinua que une los círculos blancos (o---o) corresponde a la adición de subunidades 30S. Hay que indicar que en todos los casos el material ribosómico fué preincubado 15 minutos a 30°C antes de realizar el experimento. Es interesante observar que a medida que la concentración de subunidades es menor, la curva pierde su proporcionalidad, indicando que cuando la concentración es muy baja (alrededor de 0,5 micromolar) la reconstitución es mas favorable. De todas formas dado el pequeño índice de seguridad que se tiene trabajando a niveles tan bajos de fijación no debe de hacerse ninguna conclusión al respecto.

Los cuadros blancos indican que el ácido poliuridílico

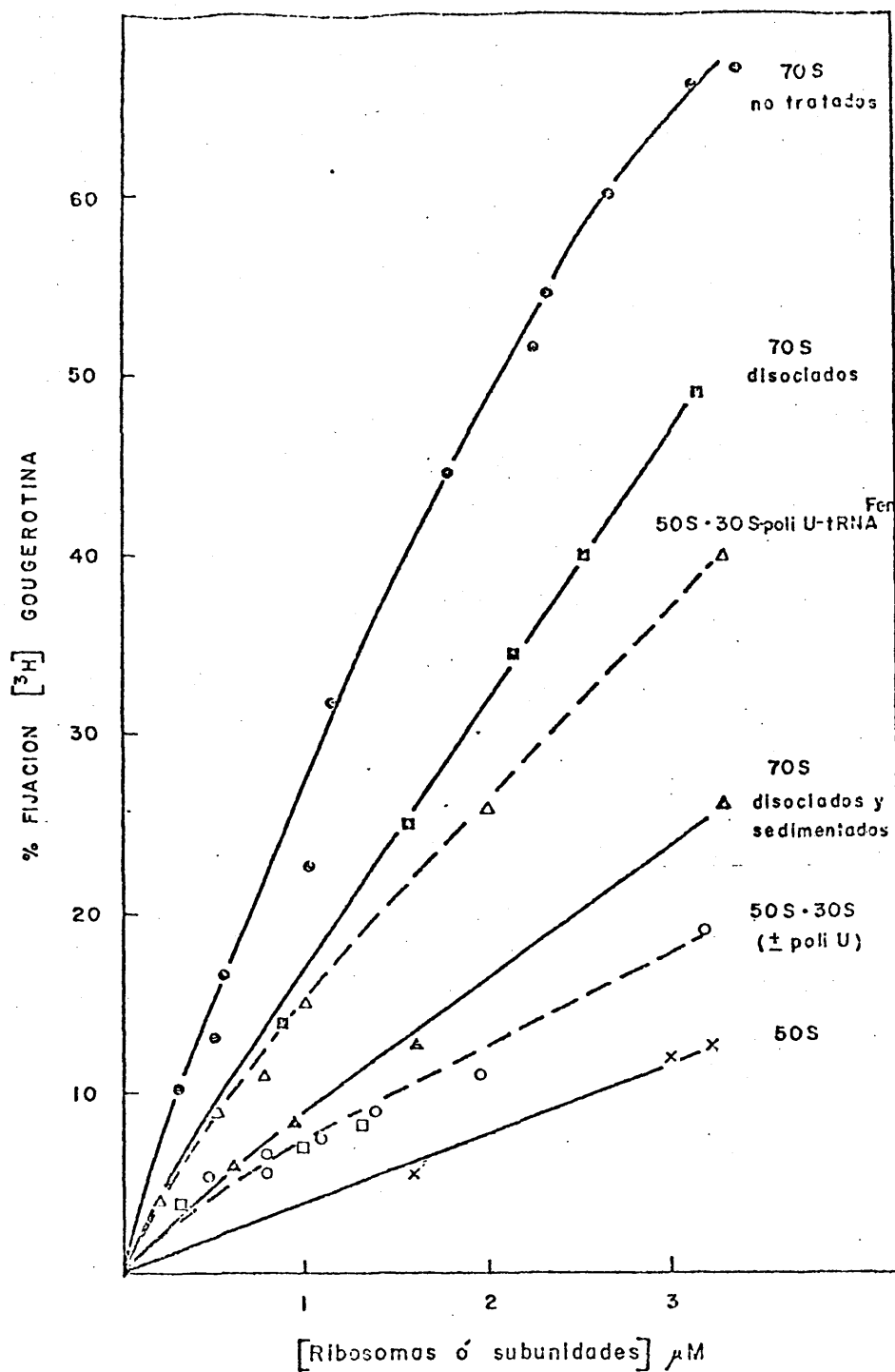


FIG.IV.22. Fijación de ^3H gougerotina a ribosomas o subunidades de *E.coli*

Otras condiciones no descritas en el gráfico: 0°C , ultracentrifugación (2 hr., excepto en X—X 6 hr.), BFB y ^3H gougerotina 10^{-6}M .

no mejora la situación. No sucede lo mismo cuando además se añade tRNA^{Fen} deacilado, específico para fenilalanina, es decir única especie codificada por poli U ($\Delta---\Delta$). Vemos que si el incremento provocado por la adición de 30S es de un 50%, la adición del tRNA provoca una estimulación en la fijación de un 110% respecto al sistema 30S·50S \pm poli U y de un 230% respecto a la subunidad 50S. Finalmente la relación entre fijación a ribosomas 70S no tratados y al complejo 30S·50S·poli U· tRNA^{Fen} es de 1,8 en la zona lineal. De estos resultados parece evidente que la fijación de gougerotina requiere una conformación ribosómica similar a la que esta macromolécula posee cuando se encuentra en la fracción polisómica.

Como continuación a este experimento se realizaron los siguientes controles. Una porción de ribosomas 70S no tratados fueron dializados a 0°C frente a un volumen mil veces superior de solución tampón de disociación de ribosomas de *E. coli*: TRIS-ClH (pH 7,4) 20 mM, cloruro magnésico 1 mM, acetato amónico 500 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM. Transcurridas 4 horas, una porción se llevó a soluciones iónicas standard (BFB) mientras que la otra fue sedimentada por ultracentrifugación (6 horas a 150.000 g) siendo resuspendida finalmente en BFB. A continuación se incubaron 15 minutos a 30°C y se pasó a estudiar su afinidad por ^3H gougerotina. Mientras que los ribosomas disociados, pero que conservan todos sus componentes originales (■—■) muestran un comportamiento muy similar a las

subunidades reasociadas en presencia de poli U y tRNA^{Fen} ($\Delta--\Delta$), aquellos que han sido centrifugados ($\Delta---\Delta$) es decir, que han perdido todos aquellos componentes de bajo peso molecular disociados del ribosoma durante la diálisis, (tRNA, mRNA o proteínas) se comportan prácticamente igual que las subunidades reasociadas por si solas (o en presencia de Poli U) (o---o).

Numericamente la pendiente de los ribosomas disociados es 1,15 veces superior a la del complejo 30S·50S·Poli U·tRNA^{Fen} mientras que los que además fueron sedimentados aparecen 1,26 veces mas "activos" en la fijación de gougerotina según el mismo criterio respecto del complejo 30S·50S. Finalmente conviene señalar que la pérdida sufrida por los ribosomas al ser disociados, a pesar de la posterior reactivación a que se les sometió, es de 1,6.

Aunque no tenemos evidencia directa es muy probable que la situación existente entre ribosomas disociados y el complejo 50S·30S·poli U·tRNA^{Fen} o entre ribosomas disociados y centrifugados, y el complejo 50S·30S (\pm poli U) sea idéntica. Esta afirmación si bien solo podría ser confirmada mediante estudios plenamente cuantitativos tales como los descritos en el apartado anterior, no parece aventurado suponer que el factor que los diferencia (tan próximo a 1) sea consecuencia de la degradación que sufren las subunidades durante el proceso de obtención. Fernández-Muñoz y cols. (1971) encuentran un factor de 1,16 entre n^{70S} y n^{50S} al estudiar la fijación de ^{14}C cloranfenicol (ver apar-

tados IV.1.3 y 4) No es mi intención sacar conclusiones definitivas de estos resultados, sin embargo no puede negarse que merced a la aplicación de los estudios de fijación de ^3H gougerotina se han planteado una serie de problemas muy a tener en cuenta a la hora de estudiar la estructura del ribosoma.

- Las subunidades 30S y 50S no son capaces de reasociarse por si solas en una partícula 70S de idéntica estructura a la de los 70S de la fracción polisómica.

- Los ribosomas 70S obtenidos según métodos standard y lavados 3 veces con alto amonio (1 M) contienen unos componentes no identificados de bajo peso molecular cuyo efecto resulta equivalente a la adición de tRNA codificado por ácido poliuridílico.

- La disociación de estos ribosomas 70S provoca una pérdida de algún componente o alternativamente un cambio conformacional, en ambos casos de forma irreversible según se pone de manifiesto por una disminución de 1,6 veces en su afinidad por gougerotina.

NOTA.- Cuando se estudia una reacción aislada y se miden inhibiciones a velocidad inicial, se cumple que el valor de la concentración de inhibidor capaz de dar un 50% de inhibición es idéntico a su K_d , en las condiciones en que tiene lugar la reacción.

Según $\bar{y} = \frac{K_A (A)}{1 + K_A (A)} = \frac{1}{2}$ de donde $K_A (A) = 1$, es decir $K_d = (A)$

Dadas las pequeñas concentraciones de ribosomas empleadas en estos ensayos puede suponerse que $A_0 = (A) + (RA)$ de donde $K_d = A_0$. Estas consideraciones solo son válidas para interacciones equimoleculares. (Ver IV.2.5).

IV.2.5. CORRELACION FIJACION ^3H GOUGEROTINA- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD PEP- TIDIL TRANSFERASA.

1.- REACCION DE LA PUROMICINA.

Tal y como ha sido norma general a lo largo de esta sección se inicia la descripción de los resultados en sistemas eucarióticos. Ha sido descrito que gougerotina no inhibe formación de enlace peptídico, ensayado según la reacción de la puromicina en levaduras (Battaner y Vázquez, 1971a) y en amígdalas palatinas humanas (Carrasco, 1973). Se ha comprobado que estas aseveraciones no son del todo ciertas a altas concentraciones del antibiótico (Fig. IV. 23A). Este experimento se ha realizado a partir del complejo N.Ac. ^{14}C Fen·tRNA-poli U-ribosomas en su forma postranslocada (ver II.3.8). La incubación a 30°C duró 2 minutos con objeto de medir velocidades iniciales de reacción tal y como se describió en el correspondiente apartado para anisomicina (IV.1.5). A partir de esta experiencia (Fig. IV.23A) puede calcularse que la $K_d^{80\text{S}}$ (30°C) es del orden 4×10^{-4} M lo que justifica que no sea posible detectar ninguna interacción del antibiótico con el ribosoma a esta temperatura con los métodos de fijación actualmente existentes. (Ver NOTA en pagina anterior).

Con ribosomas procarióticos encontramos resultados similares (Fig. IV.23B) si bien los efectos son menos pronunciados, 50% de inhibición para 6×10^{-5} M es un dato evidente del drástico efecto que posee la temperatura sobre la

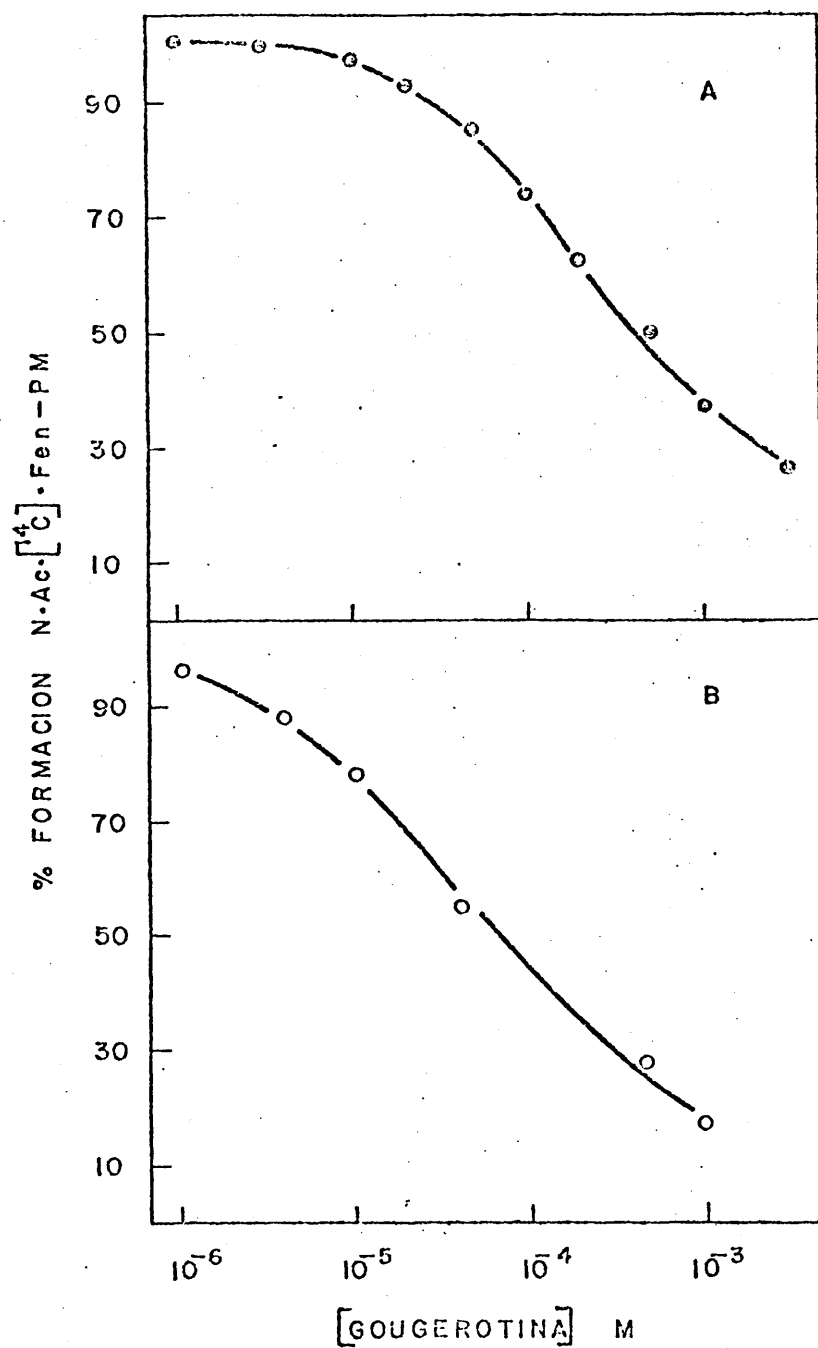


FIG.IV.23. Efecto de gougerotina sobre la reacción de la puromicina a 30°C catalizada por:

A. Ribosomas eucarióticos (*S. cerevisiae*)

B. Ribosomas procarióticos (*E. coli*)

Incubación, 2 minutos y 30 segundos, respectivamente

afinidad de este antibiótico por el ribosoma. En este caso la incubación fué de 30 segundos debido a la cinética mas rápida que presentan los ribosomas bacterianos. Si bien esta es mucho mas lenta a cero grados este ensayo permitirá correlacionar el valor de K_d con la inhibición sobre el centro activo peptidil transferasa tal y como se hizo para anisomicina. En este caso, este experimento tiene además otro sentido. Se ha preparado el complejo ternario comunmente empleado en este ensayo a partir de las subunidades ribosómicas. Dado que la presencia de poli U y de N-Ac ^{14}C Fen-tRNA semejan la situación definida en el apartado anterior por $50\text{S} \cdot 30\text{S} \cdot \text{Poli U} \cdot \text{tRNA}^{\text{Fen}}$ se podrá comprobar si la diferencia de 1.8 veces en afinidad a favor de los ribosomas intactos (suponiendo que fijen igual que el complejo) tiene su correspondencia en cuanto al efecto del antibiótico sobre la formación de enlace peptídico.

Mediante una clásica reacción de puromicina (II.3.8) y tras incubar 10 minutos a 0°C se obtuvo la figura IV.24. Puede comprobarse que hay una perfecta correlación entre la afinidad calculada según experimentos de fijación, $K_d^{70\text{S}} = 1,5 \times 10^{-6} \text{ M}$, y el resultado experimental de inhibición tanto según la curva teórica de inhibición (línea continua) como en el valor de la constante de disociación deducido de esta experiencia tal y como se ha descrito más arriba.

La línea discontinua representa la curva de inhibición obtenida cuando el complejo ternario que había de reaccionar con puromicina fué preparado a partir de las subunidades

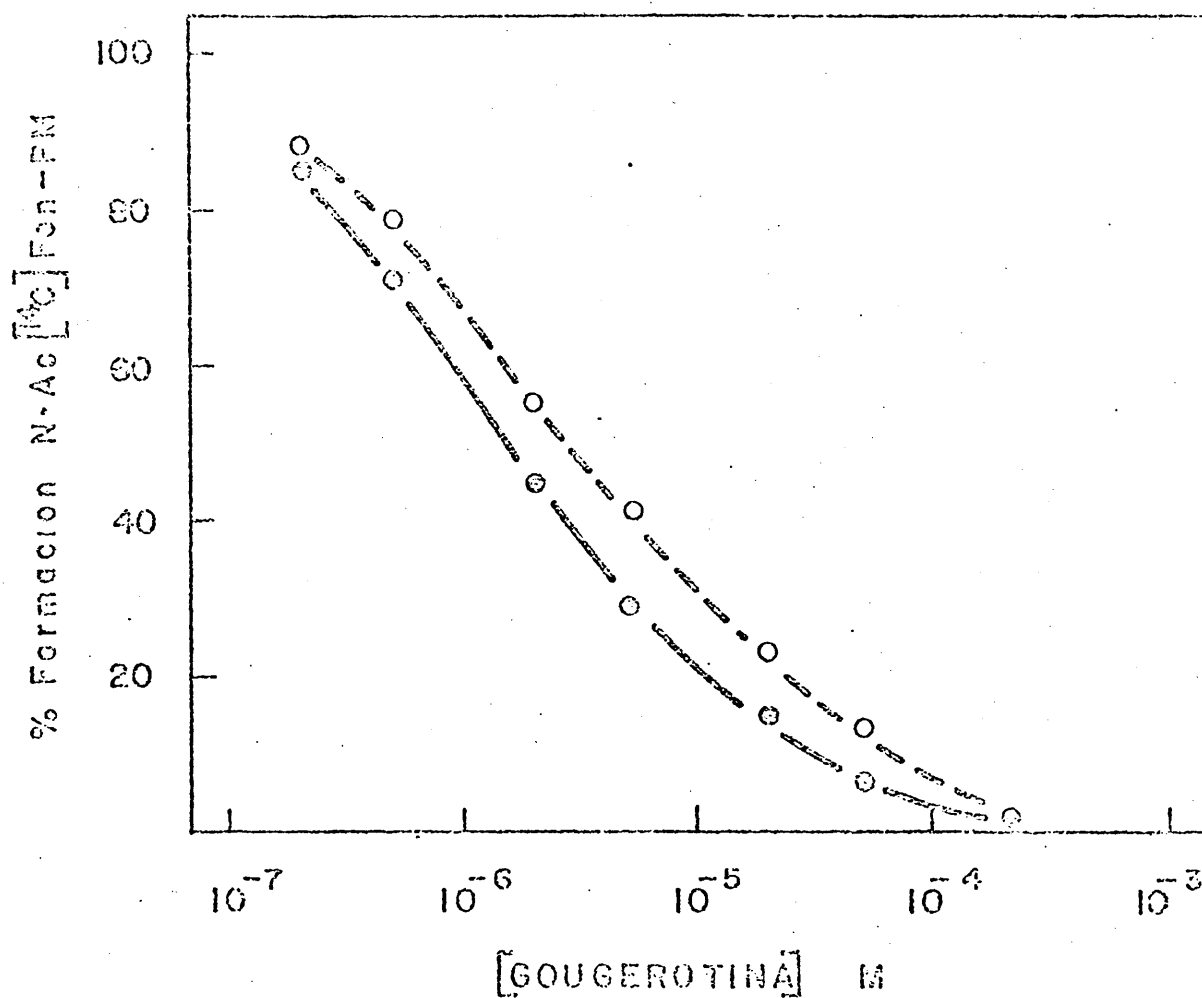


FIG.IV.24. Efecto de gougerotina sobre la reacción de la puromicina a partir del complejo postranslocado. Ribosomas y subunidades de E.coli. Temperatura 0°C.

o—o Complejo formado a partir de ribosomas 70S, Ac-¹⁴C -Fen-tRNA y poli U.

o---o Idem, a partir de subunidades 30S, 50S.

Incubación 10 minutos. Resto de las condiciones experimentales según II.3.8.

aisladas previamente. Es interesante observar que se trata de una línea paralela con la definida por los círculos negros (o curva teórica de inhibición según K_d^{70S}) que representa el resultado obtenido empleando ribosomas intactos.

La relación entre ambas es de 1,7 lo que evidencia una perfecta correlación entre el efecto de gougerotina sobre la actividad peptidil transferasa y su interacción con el ribosoma, tanto cuando se trata de ribosomas intactos o reconstituidos a partir de sus subunidades, teniendo lugar la reasociación en presencia de tRNA (aminoacilado ó no) y RNA mensajero.

IV.2.6. CORRELACION FIJACION 3H GOUGEROTINA- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD PEPTIDIL TRANSFERASA.

2.- REACCION DEL FRAGMENTO.

Por último se han querido hacer extensibles estas correlaciones fijación-actividad (o mejor dicho inhibición de actividad) al ensayo de la reacción del fragmento. Puesto que con este antibiótico no han sido realizados medidas cuantitativas precisas con objeto de determinar su constante de disociación en presencia de etanol, los resultados presentados en este apartado tendrán un valor meramente informativo. Así en el caso de ribosomas eucarióticos (Fig. IV.25A) se obtendría una K_d^{80S} (EtOH) de un valor alrededor de 7×10^{-6} M es decir unas 8 veces superior a la determinada en condiciones standard lo que concuerda, siempre es-

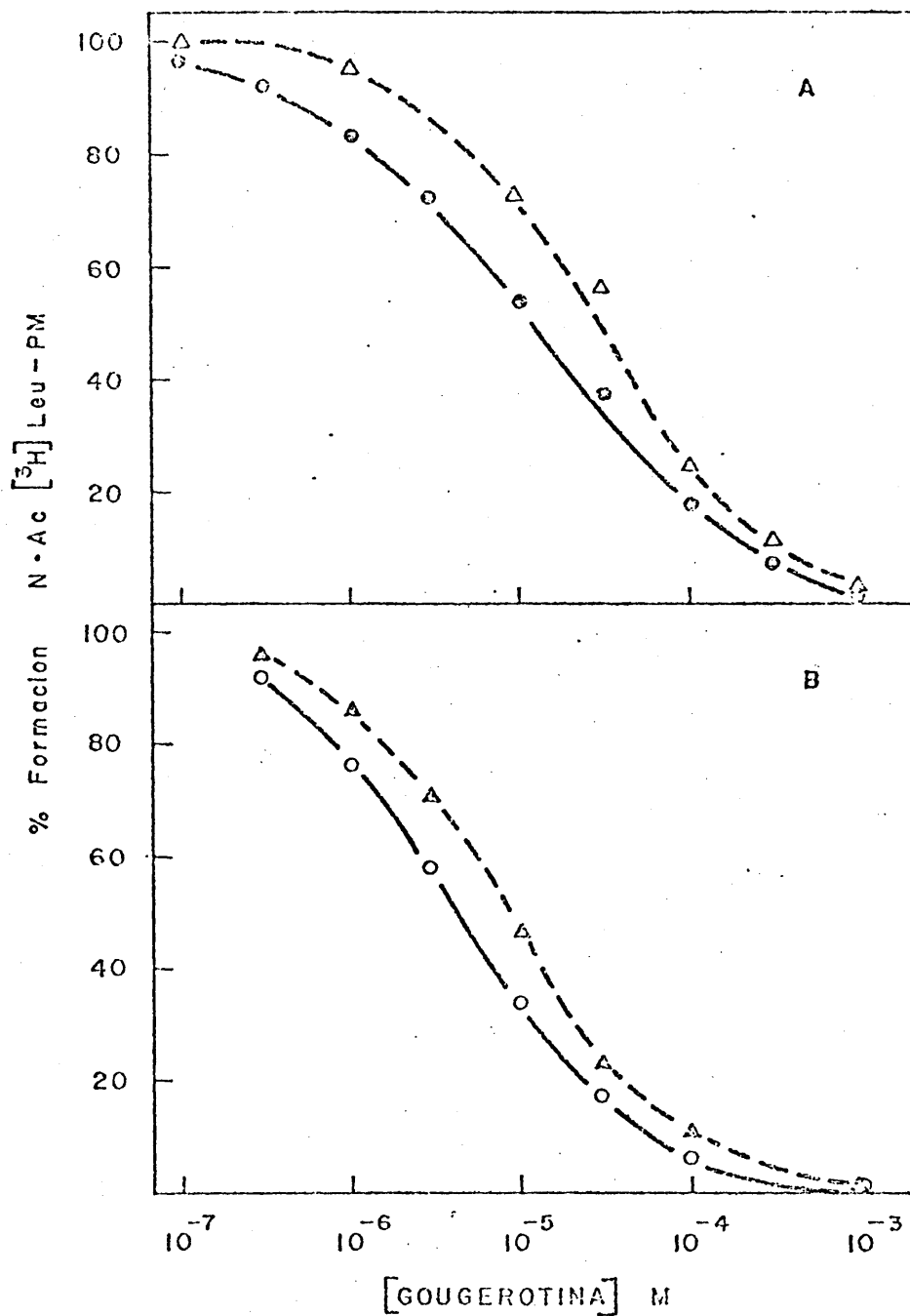


FIG.IV.25. Efecto de gougerotina sobre la reacción del fragmento catalizada por:

- A. \circ — \circ ribosomas 80S *S. cerevisiae*
 Δ --- Δ subunidades 60S *S. cerevisiae*
- B. \circ — \circ ribosomas 70S *E. coli*
 Δ --- Δ subunidades 50S *E. coli*

timativamente, con los datos presentados en el apartado IV.2.2.

Análogas correlaciones aparecen en la parte B de esta figura IV.25 donde frente a una $K_d^{70S}(\text{EtOH}) = 4 \times 10^{-6} \text{ M}$ estimada a partir del valor del 50% de inhibición, tenemos una $K_d^{70S}(\text{EtOH}) = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ deducida a partir de la figura IV.20B tomando siempre como referencia el valor de K_d^{70S} determinado cuantitativamente. Finalmente podemos deducir de la curva de inhibición obtenida utilizando subunidades 50S que $K_d^{50S}(\text{EtOH}) = 6 \times 10^{-6} \text{ M}$ que si lo comparamos con el valor de $K_d(\text{EtOH}) = 4 \times 10^{-6} \text{ M}$ obtendremos una relación numérica muy similar a la obtenida en el caso de la fijación de gougerotina en presencia de etanol (Fig.IV.20B) para un valor del 33% (v/v). Todos estos datos deben ser considerados tan solo desde un punto de vista estimativo y nunca como valores exactos siendo su función principal correlacionar los resultados procedentes de experimentos de fijación con el efecto inhibitor sobre una determinada actividad ribosómica.

IV.3. FIJACION DE ^{14}C TRICODERMINA A RIBOSOMAS EUCARIOTICOS

IV.3.1. FIJACION DE ^{14}C TRICODERMINA A RIBOSOMAS 80S DE LEVADURA. EFECTO DE CATIONES Y DE pH.

Una vez establecida la especificidad de la fijación de tricodermina, que como cabía esperar de su modo de acción, presenta las mismas características que en el caso de anisomicina, se pasó a estudiar el efecto de los cationes monovalentes, magnesio, pH y etanol en una serie de experimentos idénticos a los descritos en los apartados IV.1.2 y IV.2.2.

Los resultados, figuras IV.26 y 27, confirman la hipótesis hecha en el apartado correspondiente a gougerotina (pag.149). La propiedad de inafectabilidad encontrada en los antibióticos estudiados, dadas las peculiares características de cada uno, no puede ser una propiedad intrínseca de sus respectivos "sitios de fijación" sino de todo el centro activo con el que interaccionan. No obstante existen algunas pequeñas diferencias que conviene señalar. Mientras crecientes cantidades de magnesio producían una ligera inhibición, en el caso de tricodermina no tienen efecto (o incluso una mínima estimulación). También puede apreciarse un menor requerimiento de iones monovalentes especialmente a bajas concentraciones. Conviene recordar que a la escala de la

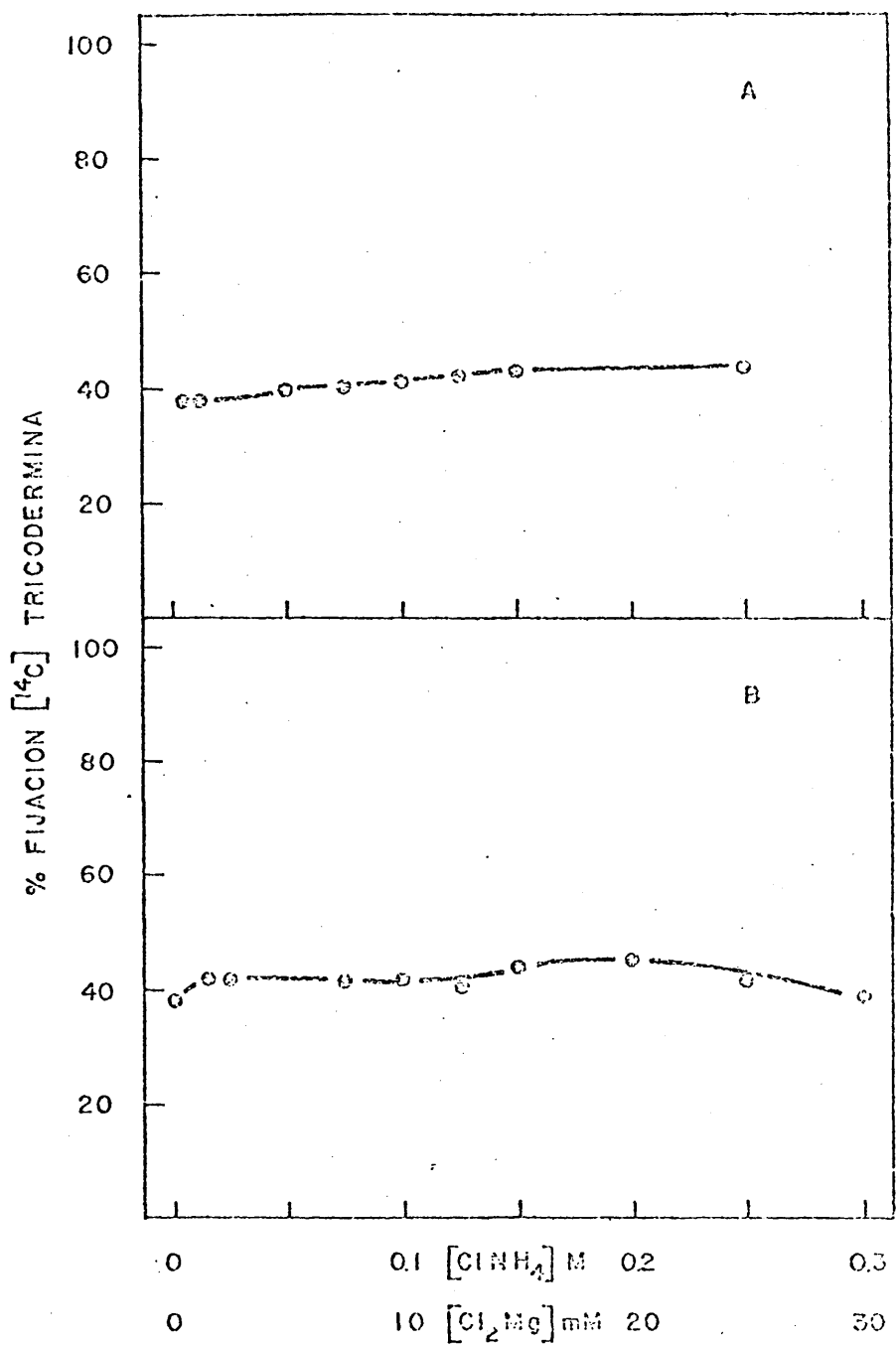


FIG. IV. 26. Fijación de ^{14}C tricodermina a ribosomas 80S de levadura.

- A. Efecto de magnesio.- Maleato amónico (pH 6,5) 50 mM y el Cl_2Mg requerido.
- B. Efecto de amonio.- TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, Cl_2Mg 12 mM y el ClNH_4 requerido.

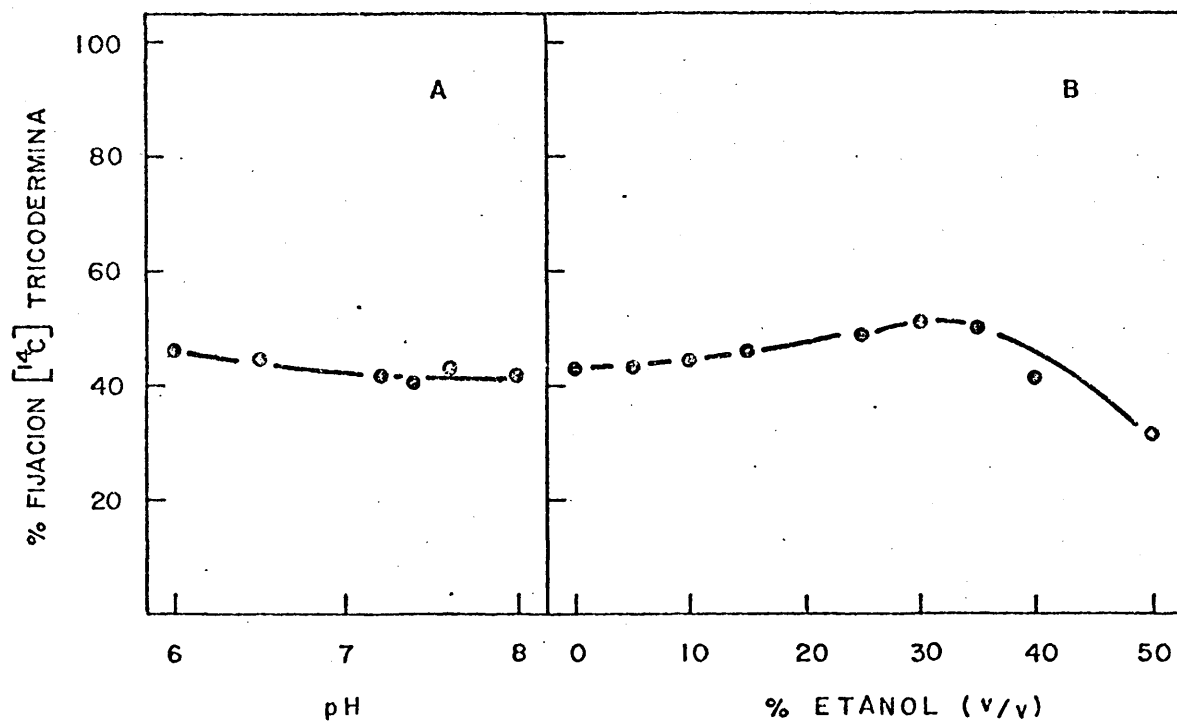


FIG.IV.27. Fijación de ¹⁴C tricodermina a ribosomas 80S de levadura.

A. Efecto de pH.- Acetato amónico (pH 6,0) 50 mM; Maleato amónico (pH 6,5) 50 mM; TRIS-ClH (pH 7,2-8,0) 50 mM. Ión amonio 100 mM y Cl₂Mg en todos los casos, 12 mM.

B. Efecto de etanol.- Maleato amónico (pH 6,5) 50 mM Cl₂Mg 12 mM y el etanol (v/v) requerido.

Otras condiciones: 0°C, ultracentrifugación, $2,5 \times 10^{-6}$ M de ribosomas y 3×10^{-6} M de ¹⁴C tricodermina.

figura hay que añadir una concentración 10 mM de ion amonio procedente de la solución de ribosomas . Por lo demás nos encontramos con una total independencia respecto del pH (en el rango 6-8) y un efecto muy poco pronunciado de etanol, pues si bien a altas concentraciones parece haber una pequeña inhibición, esta se ve precedida por un incremento a niveles intermedios, 15-35 % (v/v) del solvente orgánico.

Estos resultados permitieron aplicar las condiciones iónicas standard de fijación (BFY) a los estudios de interacción de ^{14}C tricodermina a ribosomas de levadura, mientras que cuando se trató de ribosomas humanos se utilizaron las descritas en la sección correspondiente de anisomicina, esto es BFH (II.3.13).

IV.3.2. INTERACCION DE ^{14}C TRICODERMINA CON RIBOSOMAS DE *S.cerevisiae*.

En el caso de ribosomas de levadura las condiciones experimentales fueron 2, 4 y 5×10^{-6} M para intervalos de antibiótico $0,3-5 \times 10^{-6}$ M, $0,5-3 \times 10^{-5}$ M y $3-8 \times 10^{-5}$ M respectivamente. Las concentraciones iónicas maleato amónico (pH 6,5) 50 mM, cloruro magnésico 12 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM. Dada la menor actividad específica de este antibiótico, fue necesario emplear mayores volúmenes de reacción, especialmente en aquellos tubos de bajas concentraciones. Así fueron 0,15 ml, 0,1 ml y 0,08 ml correspondiendo a los tres grupos señalados anteriormente y las alí-

cuotas tomadas por radioactividad 0,04, 0,02 y 0,015 ml respectivamente.

La técnica empleada fué la de centrifugación, la temperatura 0°C y los datos procesados de acuerdo a Scatchard (1949) tal y como se hizo anteriormente para ^3H anisomicina y ^3H gougerotina. Los resultados aparecen en la figura IV.28. Se había admitido, una vez conocidos los resultados de la fijación de ^3H gougerotina a ribosomas procarióticos y eucarióticos que la heterogeneidad ribosómica (establecida según distinta afinidad por el antibiótico) era una propiedad de la macromolécula y no del inhibidor, dado el diferencial comportamiento de ambos tipos de ribosomas. Sin embargo, ante los resultados obtenidos con ^{14}C tricodermina, si bien no modifican en lo absoluto estas conclusiones, limitan el carácter general de heterogeneidad que en un principio podía haberse pensado atribuir a los ribosomas eucarióticos. Mas aún, considerando que tricodermina es un inhibidor competitivo de la fijación de anisomicina (como se ha demostrará en apartado siguiente) resulta factible pensar que el fenomeno de heterogeneidad, depende también de la naturaleza del antibiótico. Estos dos asertos, si en un principio podían parecer contradictorios, en realidad se complementan y aunque éste tema se tratará con mas detalle en la Discusión se puede lanzar la siguiente afirmación: Hasta el presente momento todos los ribosomas procarióticos se comportan homogéneamente en cuanto a la fijación de inhibidores de la actividad peptidil transferasa, mientras

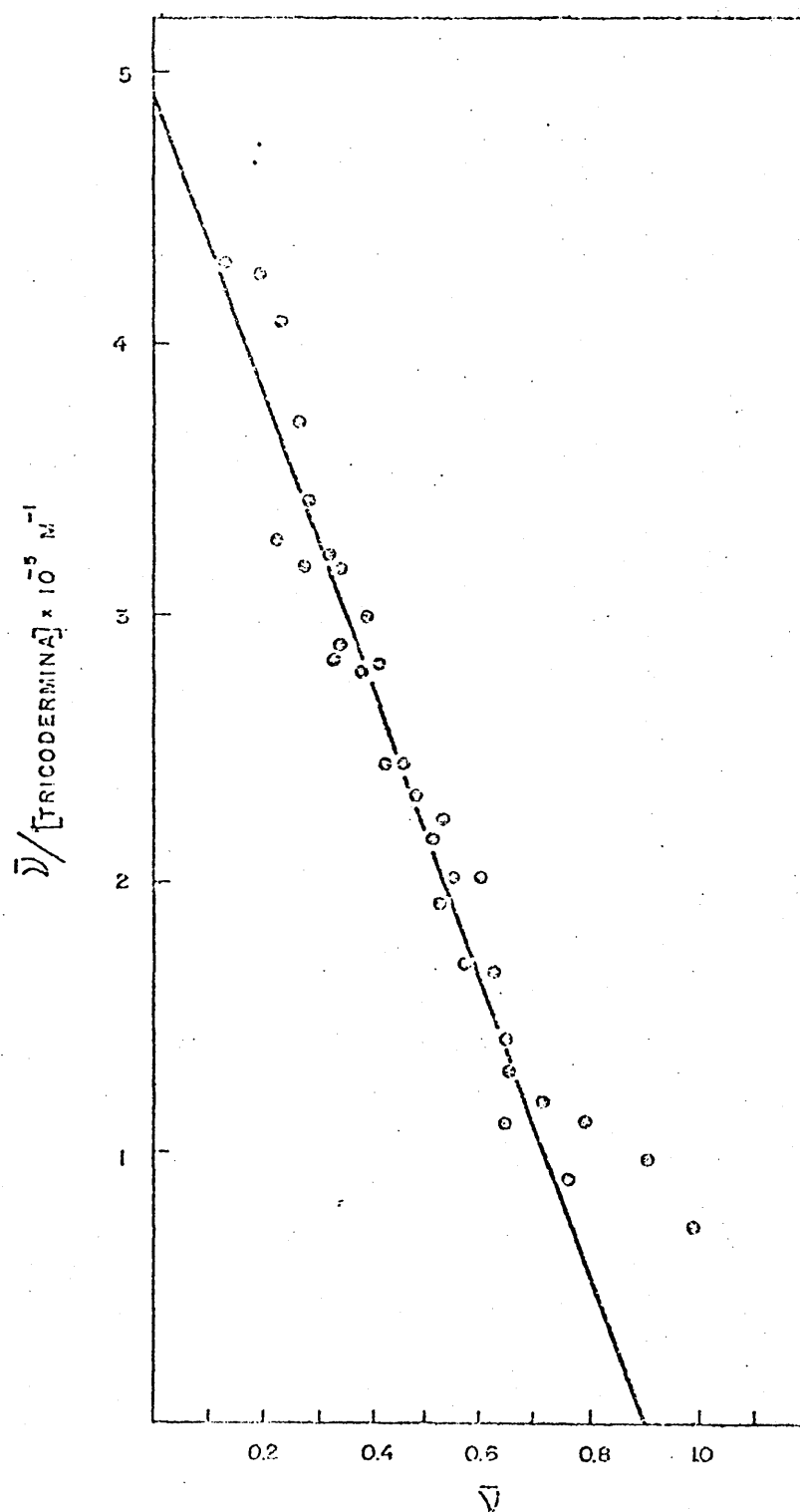


FIG.IV.28. Interacción de ^{14}C trichodermina con ribosomas de levadura.

2,4 y $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ de ribosomas para ^{14}C trichodermina $0,3-5 \times 10^{-6} \text{ M}$, $0,5-3 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $3-8 \times 10^{-5} \text{ M}$ respectivamente. 0°C , BFY y ultracentrifugación. Representación de Scatchard.

que los ribosomas eucarióticos presentan alternativamente un fenómeno de heterogeneidad (empleando siempre el criterio de fijación) dependiendo de las características intrínsecas del antibiótico y no del sitio de interacción. En el Capítulo V se demostrará que los sitios de fijación de anisomicina y tricodermina están relacionados entre sí mientras que gougerotina se fija a un sitio ribosómico totalmente independiente.

Al margen de estas consideraciones, tricodermina interacciona equimolecularmente con los ribosomas, tal y como ha venido sucediendo con todos los inhibidores activos en la subunidad mayor ribosómica, siendo el valor experimental obtenido $n = 0,9$. La afinidad resultó ser K_d^y (TRIC) $1,8 \times 10^{-6}$ M lo que representa una afinidad alrededor de 2 veces inferior a la fijación principal de gougerotina y 4 respecto a la de anisomicina.

IV.3.3. DETERMINACION DEL SITIO DE FIJACION RIBOSOMICO DE ^{14}C TRICODERMINA RESPECTO AL DE ^3H ANISOMICINA.

Los trabajos realizados en el laboratorio del Dr. Vázquez acerca del modo de acción de tricodermina (ver Introducción) tuvieron su origen en un ensayo de inhibición de la fijación de ^3H anisomicina que resultó positivo. Sin embargo, alterando el orden cronológico experimental por razones de un mayor orden y claridad en los trabajos expuestos en esta Tesis, se ha preferido agrupar todos los ensa-

yos de inhibición de la fijación de los tres antibióticos radioactivos en un capítulo único (Capítulo V). Este resultado obligaba a estudiar que tipo de relación existía entre ambos antibióticos. Tal y como se describió en el apartado de Cálculos (II.3.14), si un determinado compuesto es inhibidor competitivo de otro existente en forma radioactiva y que por consiguiente podemos medir su interacción directa con el ribosoma, se puede calcular la constante de afinidad de aquel, aunque no exista en forma radioactiva, mediante los valores de la constante de asociación aparente obtenidos para la fijación del inhibidor radioactivo en presencia de cantidades constantes del primero.

Este tipo de estudio que ya fué de gran utilidad a la hora de determinar la actividad específica real de ^{14}C tricodermina (III.3.3) vuelve a tener aplicación a la hora de caracterizar su sitio de acción respecto a anisomicina, sin mas operación que invertir los razonamientos del apartado anterior, esto es, una vez conocida K_d^y (TRIC) por medida directa, se puede calcular por medida indirecta de su efecto sobre la fijación de ^3H anisomicina. Concordancia de ambos valores serán indicación de competitividad, amén de la consideración gráfica de la intersección en el eje de ordenadas, de las rectas resultantes.

Las consideraciones experimentales fueron solución iónica standard para fijación a ribosomas de levadura (BFY), ribosomas $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ y ^3H anisomicina $0,5-4 \times 10^{-6} \text{ M}$ para la recta de círculos negros (●—●) mas la adición de tricodermina no radioactiva hasta una concentración final de

3×10^{-6} M en la recta de círculos blancos (o—o) . Con 0,1 ml de volumen final, 0,025 ml para estimación de radioactividad, 0°C y métodos de ultracentrifugación, se completan los datos experimentales de este ensayo que aparece expresado en la figura IV.29. El cruce de las rectas en el eje de ordenadas en ausencia y presencia de tricodermina, esto es, para concentración infinita de anisomicina libre en el equilibrio, es significativo de competitividad. No obstante a partir de los valores de $K_A (\text{ANIS}) = 2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (lo que corresponde a un valor de la constante de disociación a 0°C de $4,5 \times 10^{-7} \text{ M}$ que comparando con $4,3 \times 10^{-7} \text{ M}$ así como el valor $n = 0,26$ frente a $n = 0,28$ determinado en IV.1.3 son un control perfectamente válido del experimento) y $K'_A (\text{ANIS}) = 0,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (constante de asociación aparente en presencia de $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ tricodermina) se obtiene el valor de la constante de asociación de tricodermina según la expresión:

$$K_A (\text{TRIC}) = \frac{1}{3 \times 10^{-6}} \left(\frac{2,2 \times 10^6 - 0,9 \times 10^6}{0,9 \times 10^6} \right)$$

de donde $K_{d_{\text{ind}}}^y = 2,1 \times 10^{-6} \text{ M}$. Comparando este valor con el obtenido por medición directa fijando ^{14}C tricodermina a ribosomas de levadura ($K_d^y (\text{TRIC}) = 1,8 \times 10^{-6} \text{ M}$) podemos establecer sin ninguna duda que este antibiótico es un inhibidor competitivo de la fijación de ^3H anisomicina.

Sin embargo se hace necesaria una aclaración. En IV.1.3 (y apartados siguientes) se puso de manifiesto una heterogeneidad ribosómica en cuanto a la afinidad por ani-

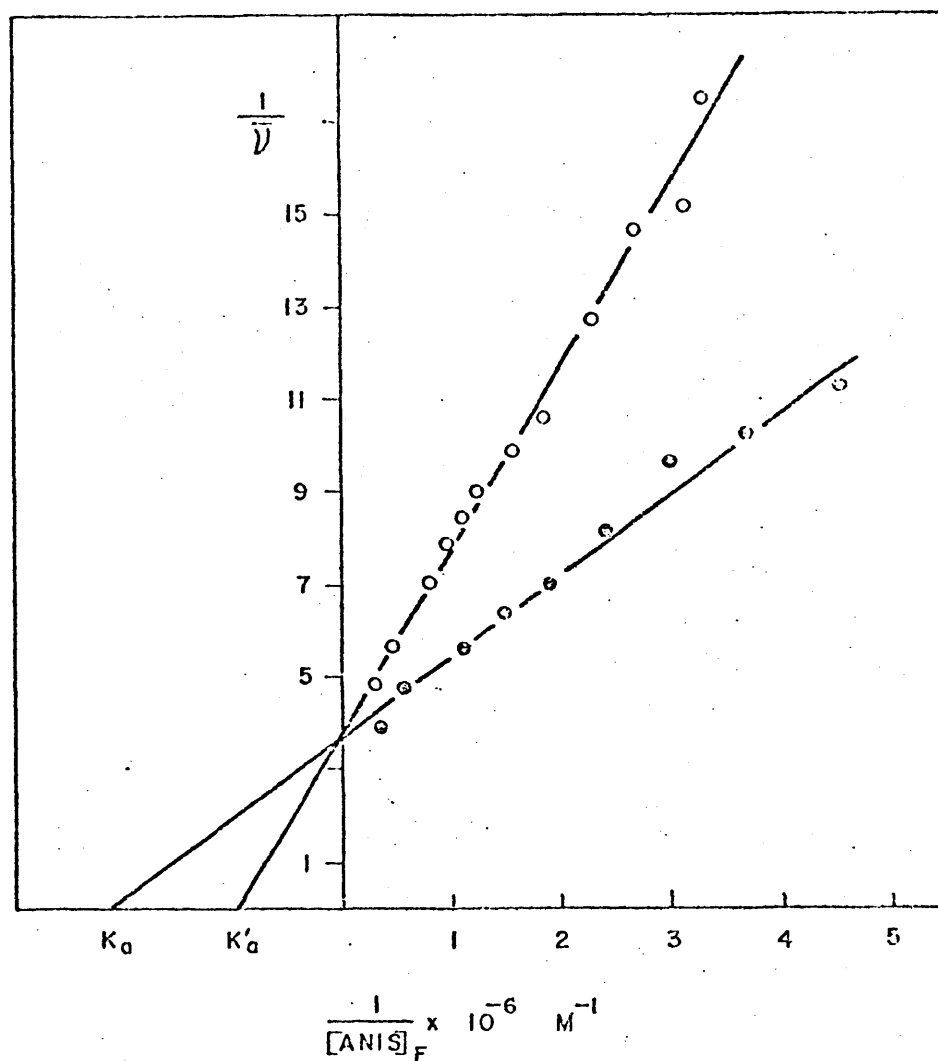


FIG. IV.29.- Competición entre la interacción de anisomicina y tricodermina con el ribosoma 80S de levadura. Representación doble recíproca.

●—● ^3H anisomicina $0,5-4 \times 10^{-6} \text{ M}$
 ○—○ Idem, mas $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ de tricodermina
 Ribosomas $3 \times 10^{-6} \text{ M}$. Otras condiciones 0°C ,
 ultracentrifugación y BFY. Resultados, ver IV.3.4.

somicina. En los intervalos de concentración empleados en este experimento se ha obtenido tan solo una de las dos fijaciones, la de alta afinidad ($K_A = 2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y $n = 0,26$) luego tan solo se debe afirmar, que tricodermina es inhibidor competitivo de la interacción de alta afinidad de anisomicina con el ribosoma citoplasmático de levadura, sin embargo en el proximo capítulo se demostrará que la interacción tricodermina-anisomicina en su fijación al ribosoma es extensible a ambas fijaciones (alta y baja afinidad).

IV.3.4. INTERACCION DE ^{14}C TRICODERMINA CON RIBOSOMAS HUMANOS.

Dado el nuevo rumbo que tomaron los estudios de interacción de antibióticos con el ribosoma eucariótico tras la demostración de homogeneidad ribosómica para la fijación de ^{14}C tricodermina, se ha tratado de extender este resultado a otros tipos de ribosomas del tipo 80S.

Al igual que se hiciera en el caso de anisomicina se escogieron los ribosomas procedentes de amígdalas palatinas humanas (IV.1.7). Se realizó un estudio de fijación directa, siendo los datos obtenidos procesados y representados según Scatchard. La figura IV.30 muestra que los ribosomas humanos al igual que los de levadura, son homogéneos en cuanto a su afinidad por tricodermina. Sin embargo, esta resultó ser superior, $K_d^{HT}(\text{TRIC}) = 6,7 \times 10^{-7} \text{ M}$ es decir aproximadamente el doble. El número de sitios, $n = 0,73$,

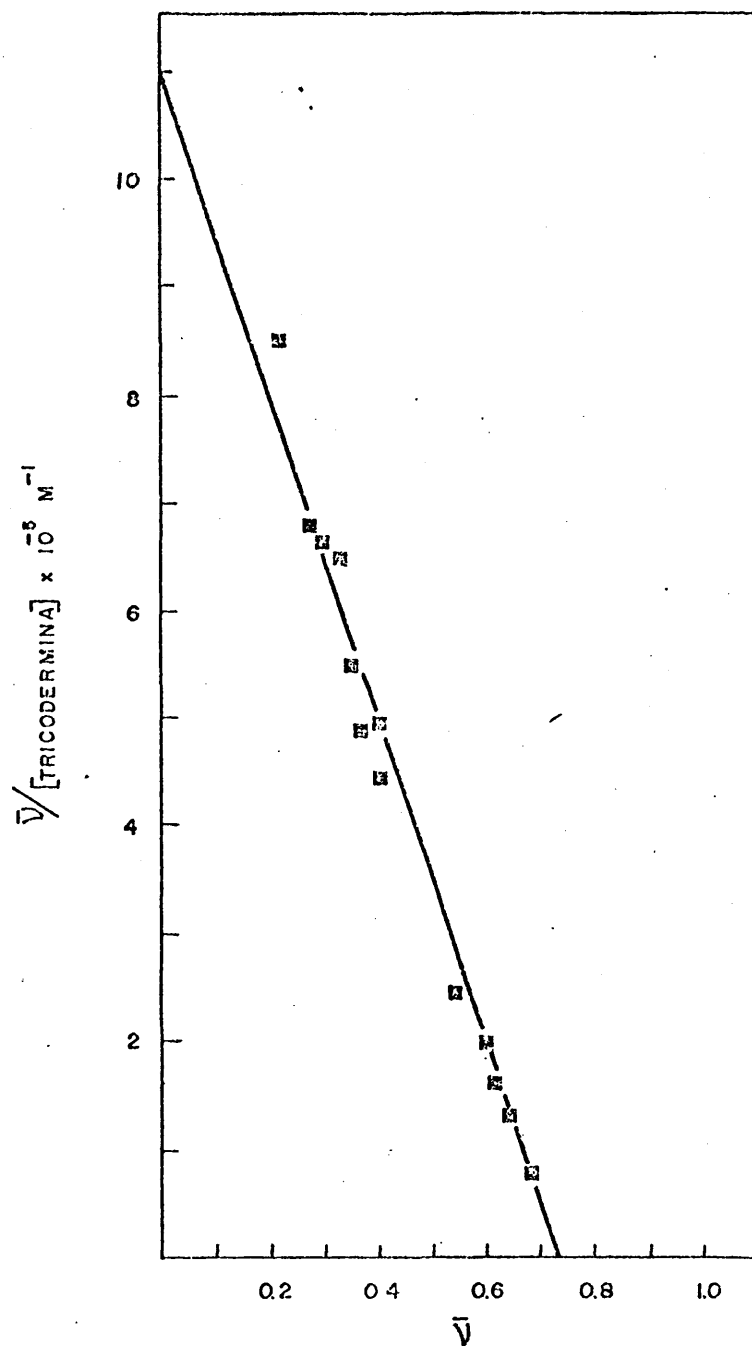


FIG.IV.30. Interacción de ^{14}C tricodermina con ribosomas humanos.

2,5 y $4,5 \times 10^{-6}$ M de ribosomas para ^{14}C tricodermina $1-5 \times 10^{-6}$ M y $0,6-5 \times 10^{-5}$ M respectivamente. 0°C , BFH y ultracentrifugación. Representación Scatchard.

vuelve a ser uno por ribosoma, considerando que una pequeña porción sean inactivos, según ha venido sucediendo con los dos antibióticos anteriormente estudiados.

Por lo demás solo resta enunciar las condiciones experimentales: TRIS-ClH (pH 7,4) 50 mM, cloruro magnésico 11 mM, cloruro potásico 60 mM y 2-mercaptoetanol 7 mM en cuanto a las concentraciones iónicas (BFH). 2,5 y $4,5 \times 10^{-6}$ M de ribosomas para intervalos de ^{14}C tri-codermina de $1-5 \times 10^{-6}$ M y $0,6-5 \times 10^{-5}$ M respectivamente. Los volúmenes finales fueron 0,1 y 0,08 ml y las alícuotas para estimación de radioactividad 0,03 y 0,02 ml respectivamente. El resto de las condiciones fueron, método de ultracentrifugación y 0°C de temperatura.

CAPITULO V

V.1 EFECTO DE INHIBIDORES

V.1. EFEECTO DE INHIBIDORES

V.1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Para mayor claridad se ha decidido agrupar en un solo capítulo el efecto de otros inhibidores de formación de enlace peptídico sobre la fijación de ^3H anisomicina, ^3H gougerotina y ^{14}C tricodermina a ribosomas. Nótese que a lo largo del Capítulo V nos referiremos a este tipo de inhibidores aunque no se indique.

En las tablas V.1,2,3 se muestran de forma enteramente esquemática los resultados que se han de ir describiendo a lo largo de este capítulo. Se intenta con ello presentar el esquema general de tal forma, que una vez localizado el antibiótico (o inhibidor) a considerar, se puedan conocer los detalles de su acción en los distintos apartados del capítulo.

Aun teniendo en cuenta la existencia de mas de una excepción, podemos, a partir del esquema general expuesto en las tablas anteriormente mencionadas, hacer una serie de consideraciones generales. Siguiendo la clásica división de inhibidores, atendiendo a su efecto sobre sistemas procarióticos, eucarióticos ó sobre ambos (Vazquez y cols., 1969b) podemos establecer las siguientes líneas de comportamiento.

-Los inhibidores de formación de enlace peptídico específicos para ribosomas eucarióticos (anisomicina, grupo de la

tricodermina y ácido tenuazónico) son inhibidores competitivos entre sí (ver IV.3.3 y V.1.4) pero no poseen ningún efecto sobre la fijación de ^3H gougerotina.

-La fijación de estos inhibidores específicos de ribosomas 80S no es prácticamente afectada por ningún inhibidor del grupo común a ambos sistemas (ni logicamente del grupo específico para procarióticos).

-La situación inversa aparece en el caso de la fijación de un antibiótico del grupo de los inhibidores comunes. ^3H gougerotina solo se ve afectada (en mayor o menor forma) por aquellos antibióticos pertenecientes a su mismo grupo mientras que los específicos, ya sea de ribosomas procarióticos o eucarióticos, tienen un efecto prácticamente nulo. Así puede hablarse de dos estructuras diferenciales y características dentro del centro activo peptidil transferasa: una que ha resistido la evolución procariotes \rightarrow eucariotes y otra específica para cada uno de los dos tipos de ribosomas. Todo ello tomando siempre como criterio la interacción inhibidor-ribosoma.

Tras estas breves consideraciones de conjunto y tras recordar que las condiciones experimentales han sido constantes para cada antibiótico a lo largo del capítulo y que ya fueron descritas con todo detalle en el apartado II.3.13 de Métodos, se pasará a describir los resultados obtenidos con cada uno de los inhibidores ensayados.

TABLA V.1

INHIBIDORES DEL CICLO DE POLIMERIZACION

SISTEMAS EUCARIOTICOS

EFECTO SOBRE LA FIJACION DE ^3H ANISOMICINA

| TOTAL | PARCIAL | NO AFECTAN |
|------------------|-------------------------|----------------|
| Tricodermina | Puromicina [†] | Gougerotina |
| Tricodermol | Verrucarina A | Blasticidina S |
| Tricotecina | Esparsomicina* * | Amicetina |
| Fusarenón X | Ac. Tenuazónico* * | Actinobolina |
| Ac. Tenuazónico* | | Esparsomicina* |
| | | Cicloheximida |
| | | Criptopleurina |

* ribosomas de amígdalas palatinas humanas

* * ribosomas de S.cerevisiae

† A concentraciones superiores a 10^{-3} M

TABLA V.2

INHIBIDORES DEL CICLO DE POLIMERIZACION

EFFECTO SOBRE LA FIJACION DE ³H GOUGEROTINA

| <u>TOTAL</u> | <u>PARCIAL</u> | <u>NO AFECTAN</u> |
|--------------|----------------|-------------------|
|--------------|----------------|-------------------|

INHIBIDORES DE SISTEMAS PROCARIOTICOS

| | |
|---------------------|-------------------------|
| Viridogriseina (37) | Cloramfenicol (5) |
| | Tiamfenicol (3) |
| | Espiramicina III (+ 15) |
| | Eritromicina (4) |
| | Oleandomicina (0) |
| | Vernamicina A (+ 30) |
| | Lincomicina (0) |

INHIBIDORES DE SISTEMAS PROCARIOTICOS

Y EUCARIOTICOS

| | |
|---|--------------------------------------|
| Blasticidina S (100) (96 ^y) | Amicetina (26) (40 ^y) |
| Esparomicina (85) (95 ^y) | Actinobolina (41) (11 ^y) |
| | Furomicina (15) (49 ^y) |

INHIBIDORES DE SISTEMAS EUCARIOTICOS

| | |
|-----------------|------|
| Anisomicina | (0) |
| Tricodermina | (0) |
| Tricotecina | (0) |
| Fusarenón X | (0) |
| Verrucarina A | (0) |
| Ac. Tenuazónico | (10) |
| Cicloheximida | (14) |

En todos los casos ³H gougerotina 10⁻⁶ M y los inhibidores 10⁻⁴ M.

En condiciones de la reacción del fragmento, viridogriseina (78) y actinobolina (97) (94^y).

TABLA V.3

INHIBIDORES DEL CICLO DE POLIMERIZACION

SISTEMAS EUCARIOTICOS

EFECTO SOBRE LA FIJACION DE ¹⁴C TRICODERMINA

| TOTAL | PARCIAL | NO AFECTAN |
|-------------------|--------------------|----------------|
| Anisomicina | Verrucarina A | Gougerotina |
| Ac. Tenuazónico * | Ac. Tenuazónico ** | Blasticidina S |
| Tricodermol | Puromicina † | Amicetina |
| Tricotecina | | Actinobolina |
| Fusarenón X | | Esparsomicina |
| | | Cicloheximida |
| | | Criptopleurina |

* ribosomas de amígdalas palatinas humanas

** ribosomas de S. cerevisiae

† A concentraciones superiores a 10^{-3} M.

V.1.2. INTERACCIONES MUTUAS ENTRE ANISOMICINA, GOUGEROTINA Y TRICODERMINA

Prácticamente han sido ya avanzados en el capítulo precedente los resultados que hubiera correspondido situar en este apartado; no obstante vamos a exponerlos brevemente.

Gougerotina no tiene efecto sobre la fijación de ^3H anisomicina ó ^{14}C tricodermina (Tabla V.4) análogamente, anisomicina y tricodermina no impiden la interacción de ^3H gougerotina con el ribosoma eucariótico (Tabla V.2).

Sin embargo, tricodermina inhibe completamente la fijación de ^3H anisomicina a ribosomas 80S, tanto de levadura como procedentes de amígdalas palatinas humanas, siendo el efecto mas marcado en este último caso (Fig. V.1A). Esta situación concuerda perfectamente con los valores obtenidos para las constantes de disociación en cada caso: así mientras que $K_{d1}^{0^\circ\text{C}}$ (ANIS) = $4,3 \times 10^{-7} \text{ M}$ y K_d^y (TRIC) = $1,8 \times 10^{-6} \text{ M}$ para levadura, K_{d1}^{HT} (ANIS) = $1,6 \times 10^{-6} \text{ M}$ y K_d^{HT} (TRIC) = $6,7 \times 10^{-7} \text{ M}$ en el caso de ribosomas humanos, es decir anisomicina se fija con mas afinidad que tricodermina en el primer caso mientras que en el segundo se invierte la situación. Ya quedó demostrado en el caso de levaduras (IV.3.3) que tricodermina es un inhibidor competitivo de la fijación de ^3H anisomicina a ribosomas, al menos en lo que se refiere a su fijación de alta afinidad definida por $K_{d1}^{0^\circ\text{C}}$.

TABLA V.4

INHIBIDORES DEL CICLO DE POLIMERIZACION
EFECTO SOBRE LA FIJACION DE ^{14}C TRICODERMINA
y ^3H ANISOMICINA

| INHIBIDOR (10^{-4} M) | ^{14}C TRICODERMINA | ^3H ANISOMICINA | |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------------|---------|
| | levaduras | levaduras | humanos |
| <u>ESPECIFICOS EUCAR.</u> | | | |
| Anisomicina | 75 | 100 | 100 |
| Tricodermina | 96 | 85 | 96 |
| Tricodermol | 62 | 64 | 80 |
| Tricotecina | 84 | 92 | 100 |
| Fusarenón X | 77 | 76 | 82 |
| Verrucarina A | 40 | 16 | 13 |
| Ac. Tenuazónico | 9* | 8 | 87 |
| Cicloheximida | 4 | 2 | 1 |
| <u>COMUNES</u> | | | |
| Esparsomicina | 8 | 32 | 12 |
| Puromicina | 0 | 0 | 0 |
| Gougerotina | | | |
| Blasticidina S | | | |
| Amicetina | | | |
| Actinobolina | | | |

^3H anisomicina 10^{-6} M; ^{14}C tricodermina 3×10^{-6} M

* 43% de inhibición con ribosomas humanos

Consecuentemente se estudió el efecto de anisomicina sobre la interacción de ^{14}C tricodermina con ribosomas de *S.cerevisiae*. Vemos (Fig. V.1B) que es capaz de producir inhibición total. Esta observación se suma a los razonamientos hechos en la sección IV.1 para demostrar que los dos tipos de fijación existentes en el caso de ^3H anisomicina ocurren sobre ribosomas distintos; de otro modo y dada la interacción de tricodermina con un 90% (al menos) de ellos no se hubiera podido obtener la inhibición total antes mencionada. Mas aún, vemos que a pesar de que $K_{d1}^{0^\circ\text{C}}(\text{ANIS}) < K_d^y(\text{TRIC})$ aparece tricodermina como mejor inhibidor de la fijación de anisomicina (parte A de la figura) que anisomicina de la fijación de tricodermina (parte B). Esto es consecuencia de que un 56% de los ribosomas fijan anisomicina según $K_{d2}^{0^\circ\text{C}}$ que representa una afinidad 3-4 veces inferior a la descrita por $K_d^y(\text{TRIC})$. También hay que tener presente que mientras ^3H anisomicina se encuentra a una concentración de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ^{14}C tricodermina está $3 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Un análisis detallado de la curva de inhibición correspondiente a este último concuerda con la situación descrita para ambos antibióticos en el Capítulo IV; así la lenta inhibición obtenida a bajas concentraciones de anisomicina (10^{-6} - 10^{-5} M), se corresponde con una situación en la que este antibiótico desplaza a tricodermina del 28% de los ribosomas (esto es, ribosomas de alta afinidad), mientras que no produce ningún efecto sobre el resto (ribosomas de ba-

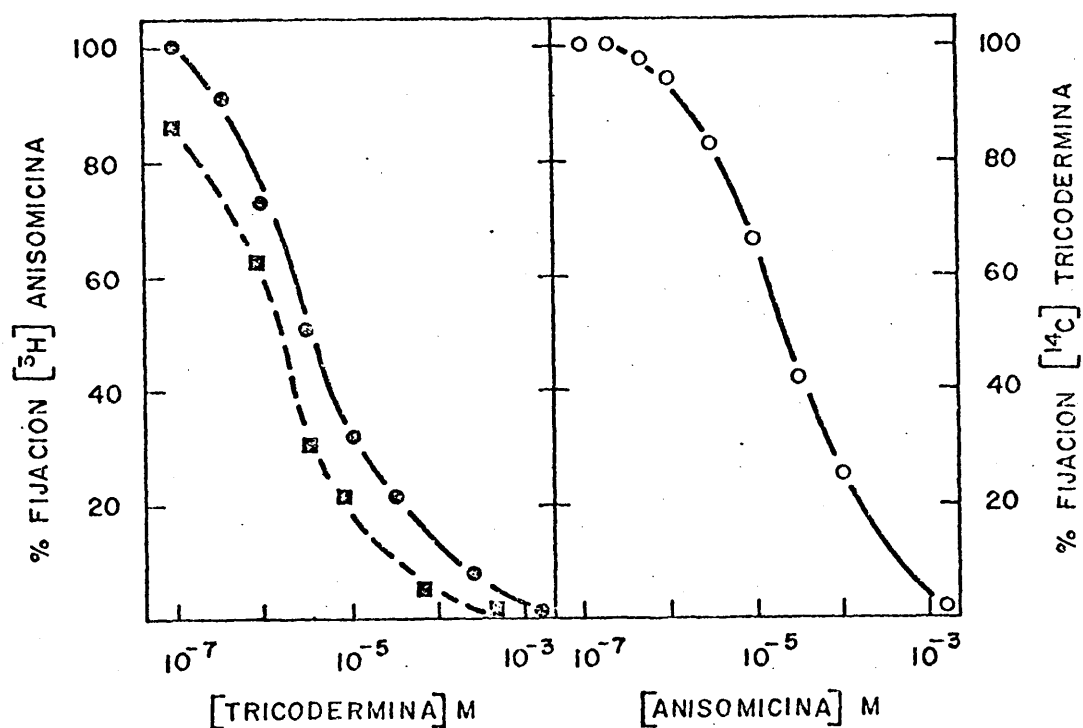


FIG.V.1. Interacción tricodermina-anisomicina

- A. Inhibición de la fijación de ³H anisomicina a ribosomas 80S de *S.cerevisiae* (●—●) y amígdalas palatinas humanas (■---■) por tricodermina.
- B. Inhibición de la fijación de ¹⁴C tricodermina a ribosomas 80S de *S.cerevisiae* (○—○) por anisomicina.

Condiciones experimentales, ver II.3.13.

ja afinidad). De esta forma ^{14}C tricodermina verá incrementada su concentración en la solución, lo que provoca una mayor fijación a los ribosomas libres (no acomplexados con anisomicina). Esta situación a nivel microscópico se ve reflejada macroscópicamente por una lenta inhibición hasta aquellas concentraciones de anisomicina en que ésta pueda desplazar a tricodermina de los ribosomas de baja afinidad (concentraciones superiores a 10^{-5} M).

V.1.3. INHIBIDORES DEL GRUPO DE TRICODERMINA

Se han estudiado tricodermol, tricotecina, fusarenón X y verrucarina A cuyas estructuras y principales características pueden encontrarse en Introducción (I.3.3).

Todos ellos se comportan como inhibidores de la formación de enlace peptídico ensayada por la reacción de la puromicina ó del fragmento (Carrasco, Barbacid y Vazquez, 1973). Este común mecanismo de acción no se corresponde con los ensayos que se describen en este apartado.

Según puede observarse en la tabla V.2 y siguiendo las las normas generales de "comportamiento" de los antibióticos específicos para ribosomas eucarióticos, no afectan en absoluto la fijación de ^3H gougerotina. Las diferencias comenzaron a aparecer al estudiar su efecto sobre la fijación de ^3H anisomicina (Fig. V.2). Mientras que tricodermol (A), tricotecina (B) y fusarenón X (C) se comportan paralelamente a tricodermina, verrucarina A (D) produce una inhibi-

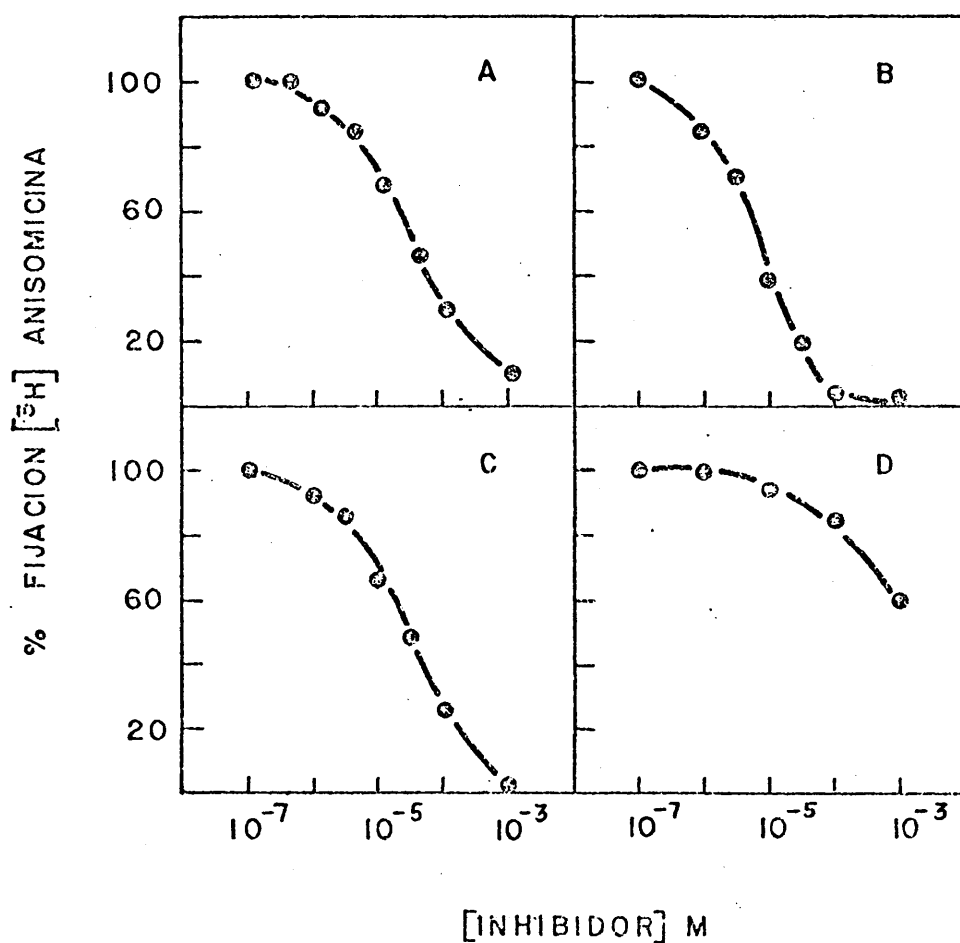


FIG.V.2. Fijación de ^3H anisomicina a ribosomas 80S de *S.cerevisiae*. Efecto de antibióticos sesquiterpénicos.

A. Tricodermol, B. Tricotecina, C. Fusarenón X y D. Verrucarina A.

^3H anisomicina 10^{-6} M y ribosomas $2,5 \times 10^{-6}$ M.

Otras condiciones: 0°C , BFY y ultracentrifugación.

ción parcial, pero a concentraciones tan elevadas como para pensar que este efecto no se corresponde con la fijación responsable de la inhibición de formación de enlace peptídico.

Figura V.3 muestra el efecto de este grupo de antibióticos sobre la fijación de ^{14}C tricodermina a ribosomas de levadura. Mientras tricodermol, tricotecina y fusarenón X producen de nuevo inhibiciones totales, verrucarina A presenta un comportamiento muy similar al descrito en el caso de su interacción con la fijación de anisomicina. Sin embargo la situación es ligeramente distinta, pues si bien la inhibición es parcial, esta se produce a concentraciones de verrucarina A, entre 0,6 y 10×10^{-6} M que bien se pueden corresponder con los rangos de inhibición de enlace peptídico.

Dado que verrucarina A, así como fusarenón X fueron descritos como inhibidores de enlace peptídico sobre la base de su efecto en la reacción del fragmento, por otra parte el efecto mas pronunciado entre los inhibidores hasta ahora conocidos, (Carrasco, Barbacid y Vázquez, 1973) y (Battner y Vázquez, 1971a) se estudió el comportamiento de ambos inhibidores en las condiciones de este ensayo (FRY). La situación (Fig. V.4) aparece mucho mas clara ya que ambos se comportan como buenos inhibidores de la fijación de ^{14}C tricodermina pudiéndose deducir que en estas condiciones poseen afinidades mas elevadas, lo que concuerda con su mayor efecto sobre la reacción del fragmento. Así mismo dada la estabilización de la curva experimental (en un 35% de inhibición para verrucarina A y en un 80% por

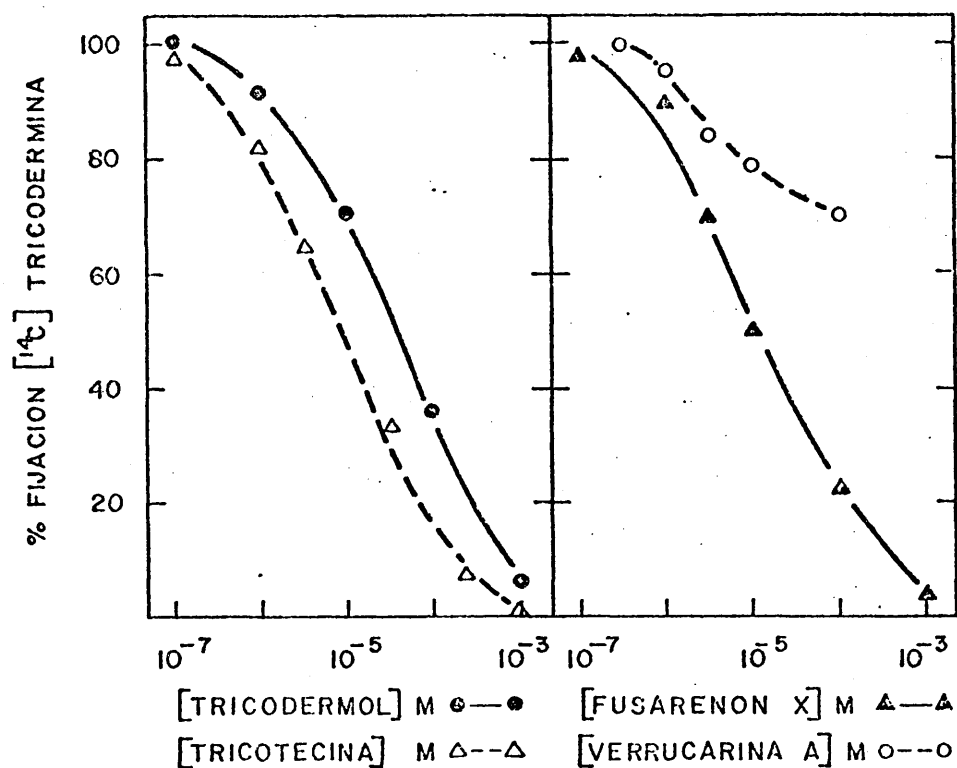


FIG.V.3. Efecto de antibióticos sesquiterpénicos sobre la fijación de ^{14}C tricodermina a ribosomas 80S de levadura.

Condiciones iónicas BFY, temperatura 0°C y experimento de ultracentrifugación.

Otras condiciones: $2,5 \times 10^{-6}$ M de ribosomas y 3×10^{-6} M de ^{14}C tricodermina.

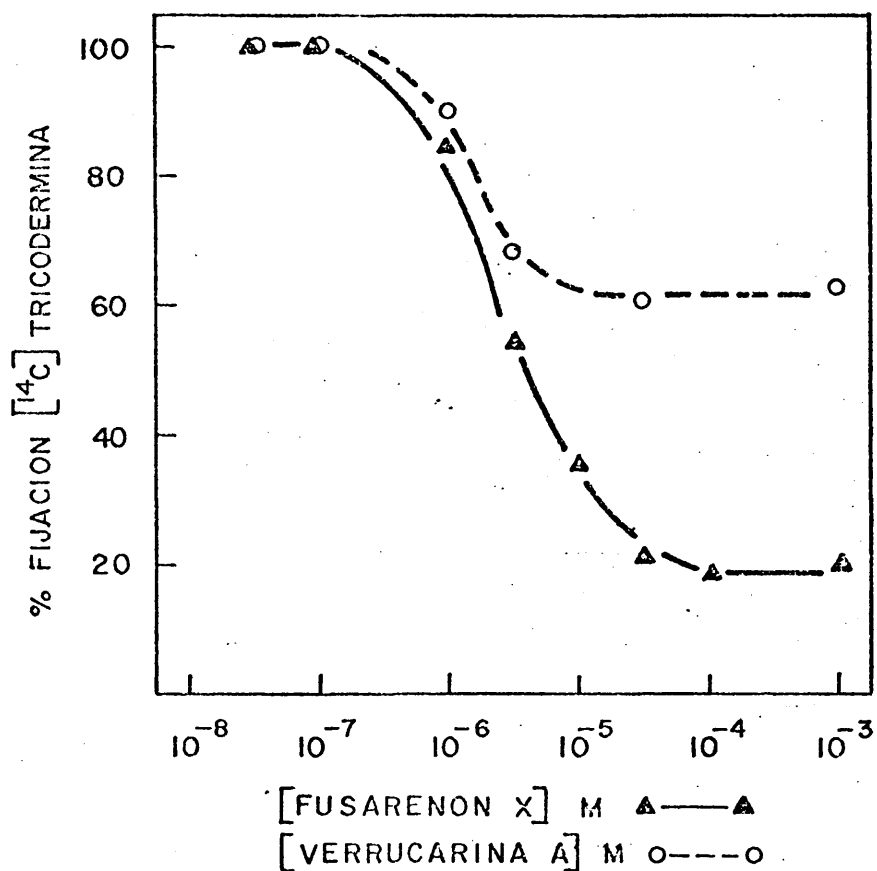


FIG.V.4. Efecto de verrucarina A y fusarenon X sobre la fijación de ^{14}C tricodermina a ribosomas 80S de levadura en las condiciones de la reacción del fragmento.

▲—▲ Fusarenón X; o---o Verrucarina A

0°C de temperatura, experimento de sedimentación por etanol, $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ de ^{14}C tricodermina y $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ de ribosomas fueron las restantes condiciones experimentales.

fusarenón X), parece lógico suponer que verrucarina A, único antibiótico del grupo que posee una estructura ampliamente diferenciada del resto (Fig. 1.5), se fija en un sitio muy próximo al de tricodermina, sin embargo solo un determinado porcentaje de ribosomas son capaces de interaccionar con el inhibidor (tal y como sucedía con ^3H anisomicina). Sin embargo en condiciones standard (BFY) es decir en ausencia de etanol, la afinidad de este antibiótico parece disminuir, siendo su efecto menos claro. La diferencia encontrada para fusarenón X en cuanto a su capacidad para producir total inhibición en condiciones standard pero solo parcial en condiciones de reacción del fragmento, puede obedecer al mismo fenómeno apuntado anteriormente para verrucarina A, es decir, la presencia de etanol imposibilita la fijación de fusarenón X a una pequeña porción de ribosomas que sin embargo conservan su afinidad por tricodermina.

Finalmente la tabla V.5 pone de manifiesto que al igual que sucedió con el representante de este grupo de inhibidores, tricodermina, todos ellos producen una mayor inhibición sobre la fijación de ^3H anisomicina a ribosomas humanos que a ribosomas de levadura. Así se confirma la mayor afinidad de estos antibióticos sesquiterpénicos por los ribosomas procedentes de amígdalas palatinas humanas.

V.1.4. ACIDO TENUAZONICO

En 1971, Battaner y Vázquez, utilizando un sistema

acelular de levaduras, establecieron el mecanismo de acción de los inhibidores del proceso de crecimiento de la cadena peptídica en organismos eucarióticos. Esta etapa de polimerización fué estudiada posteriormente por Carrasco, (1973) en un sistema acelular derivado de amígdalas palatinas humanas en el que habían sido aislados todos los componentes de este proceso, es decir ribosomas y factores de polimerización (EF 1 y EF 2). Al ensayar el modo de acción de antibióticos en cada una de las secuencias existentes entre la formación de dos enlaces peptídicos, se encontró un gran paralelismo con los resultados que Battaner y Vazquez habían obtenido en levaduras. Tan solo hubo una excepción, el ácido tenuazónico, que mientras aparecía como buen inhibidor de formación de enlace peptídico catalizado por ribosomas humanos, no tenía efecto en levaduras. Posteriores estudios por Carrasco, (1973) han demostrado que este inhibidor solo muestra su acción en ribosomas procedentes de mamíferos.

Ante tan sugestiva situación se trató de estudiar la interacción de este antibiótico con los ribosomas. Así en la figura V.5 aparece su efecto sobre la fijación de ^3H anisomicina (A) y ^{14}C tricodermina (B). En ambos casos, las líneas continuas que unen los círculos expresan los resultados utilizando ribosomas de *S. cerevisiae*, mientras que líneas discontinuas y los rectángulos corresponden a ribosomas humanos. En estos últimos la inhibición es total, mientras que en los primeros solo produce inhibiciones parciales a concentraciones muy elevadas. Por tanto, la magnitud

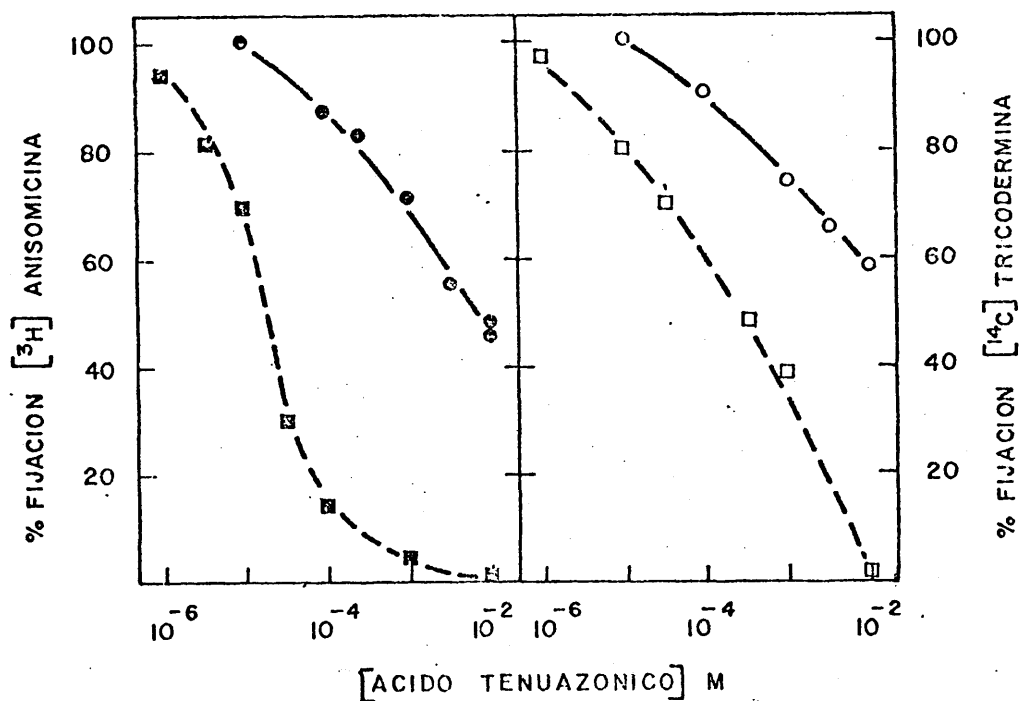


FIG.V.5. Efecto del ácido tenuazónico sobre la fijación de

- A. ^3H anisomicina a ribosomas 80S de levadura (●—●) y de amígdalas palatinas humanas (■---■).
- B. ^{14}C tricodermina a ribosomas 80S de levadura (○—○) y de amígdalas palatinas humanas (□---□).

Temperatura 0°C , experimento de ultracentrifugación. Demás condiciones ver II.3.13.

de su interacción con los ribosomas es la causa del diferencial comportamiento de este inhibidor a lo largo de la escala filogenética tal y como ha establecido Carrasco. Esta experiencia pone de manifiesto que la capacidad inhibidora del ácido tenuazónico es muy superior en el caso de anisomicina. Esto podría ser explicado por una interacción de carácter directo (competitiva) entre ambos antibióticos (esto será demostrado mas adelante) mientras que con tricodermina esta interacción fuera tan solo parcial. Sin embargo dada la competitividad existente entre anisomicina-tricodermina y anisomicina-ácido tenuazónico no parecería extraño que este triángulo quedara cerrado con la competición entre tricodermina y ácido tenuazónico. Si bien no existe una base experimental que confirme esta hipótesis, la situación en la figura V.6B sería paralela a la encontrada estudiando la interacción de anisomicina con ^{14}C tricodermina (Fig. V.1B) donde el efecto inhibidor era inferior a lo esperado debido a la heterogeneidad presentada por el primero de ellos. Por tanto resulta factible suponer que ácido tenuazónico presente unas características de fijación similares a anisomicina (dos tipos de afinidad). Esta hipótesis solo podría ser confirmada si este inhibidor fuera marcado con isótopos radioactivos.

Mediante un experimento similar a los descritos en II. 3.14, III.3.3 y IV.1.7, se trató de establecer si la interacción anisomicina-ácido tenuazónico era de carácter competitivo o no y en el caso que lo fuera, calcular la constante de disociación para el ácido tenuazónico. El experimento fué

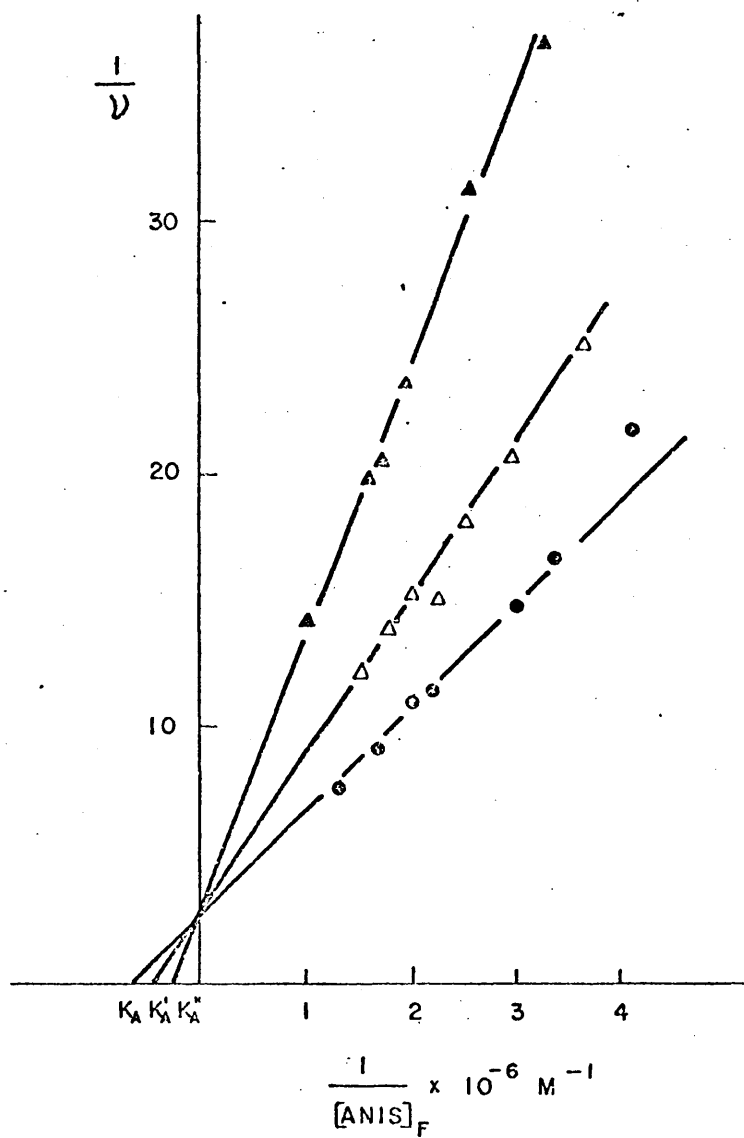


FIG.V.6. Cálculo de la afinidad del ácido tenuazónico por ribosomas humanos. Medida indirecta a partir de su efecto sobre la fijación de ^3H anisomicina.

- ^3H anisomicina 0,5-1,5 $\times 10^{-6} \text{ M}$
- Δ—Δ Idem, más ácido tenuazónico 10 $^{-5} \text{ M}$
- ▲—▲ Idem, 3 $\times 10^{-5} \text{ M}$.

Ribosomas 3 $\times 10^{-6} \text{ M}$. Otras condiciones 0°C y BFH.

idéntico al descrito en III.3.3 a excepción de que se emplearon ribosomas procedentes de amígdalas palatinas humanas (3×10^{-6} M) lo que implicaba utilizar las condiciones descritas como BFH (ver II.3.13 ó Apéndice I). Finalmente, las concentraciones de anisomicina tritiada fueron $0,5-1,5 \times 10^{-6}$ M. La figura V.6 muestra en círculos negros (●—●) el resultado control, mientras que los triángulos blancos (Δ—Δ) corresponden a la presencia de ácido tenuazónico 10^{-5} M y los negros (▲—▲) a 3×10^{-5} M. Haciendo los cálculos pertinentes a partir de los valores de la constante de asociación K_A (cuya inversa $1,7 \times 10^{-6}$ M se corresponde perfectamente con el valor obtenido en IV.1.8) y constantes aparentes K'_A y K''_A se obtuvo un valor para la afinidad del ácido tenuazónico de $K_d^{HT}(\text{TNA}) = 2,2 \times 10^{-5}$ M es decir 13 veces inferior a la presentada por anisomicina ($K_{d1}^{HT}(\text{ANIS})$). La competitividad de esta interacción viene señalada por la intersección de las tres rectas en un único punto del eje de ordenadas ($n = 0,4$). La puntualización hecha en III.3.3 es aplicable en este caso. Es decir la experiencia ha sido realizada considerando tan solo la fijación de alta afinidad de anisomicina.

A partir de estos resultados y los obtenidos en V.1.2 y 3 podemos establecer que los inhibidores de enlace peptídico específicos para ribosomas eucarióticos actúan en un centro común (lo que no quiere decir en una estructura ribosómica común), siendo imposible que un ribosoma interaccione con dos (ó mas) de estos inhibidores en un mismo instante.

V.1.5. ESPARSOMICINA

Es un inhibidor de formación de enlace peptídico activo en sistemas procarióticos y eucarióticos, mostrándose como inhibidor competitivo de puromicina cuando esta induce la liberación de polifenilalanina de ribosomas conteniendo polifenilalanil-tRNA (Goldberg y Mitsugi, 1966). Idénticos resultados se obtuvieron al estudiar esta reacción partiendo de Ac-Fen-tRNA (Pestka, 1970b). Esparsomicina también se comporta como un inhibidor de formación de enlace peptídico cuando esta actividad es ensayada según la reacción del fragmento (Monro y Vázquez, 1967) y (Battaner y Vázquez, 1971a). Sin embargo la acción de este antibiótico no parece incidir directamente sobre esta reacción. Así Herner, Goldberg y Cohen mostraron en 1969 que la fijación no enzimática de Ac-Fen-tRNA a ribosomas en presencia de poli U era estabilizada por el antibiótico. Mas aun, en 1970 Jimenez, Monro y Vazquez encontraron que este sustrato de peptidil transferasa podía fijarse al ribosoma en ausencia de mRNA siendo esta fijación dependiente de esparsomicina. Su mecanismo de acción quedó establecido como formador de un complejo inerte entre peptidil-tRNA (ó análogos) y ribosomas, a partir de los experimentos de Monro, Celma y Vázquez (1969) llevados a cabo con fragmentos aminotermiales de Ac-Leu-tRNA. Recientemente Busiello y Di Girolamo (1973) han mostrado que esparsomicina no inhibe formación de enlace peptídico cuando en un sistema acelular se consigue que el sustrato donador sea aminoacil-tRNA. Harris y Pestka

(1973) reportaron un efecto inhibitor sobre la fijación de fragmento aceptor (CACCA-Fen) a ribosomas a bajas concentraciones, mientras que a altas (10^{-4} M y superiores) producen una estimulación paralela a la del fragmento acetilado.

Por lo que respecta a su interacción con los ribosomas, esparsomicina no inhibe fijación de ^{14}C cloranfenicol, ^{14}C lincomicina ó ^{14}C eritromicina (Fernández-Muñoz y cols, 1971) pero sí ^3H puromicina (Fernández-Muñoz y Vázquez, 1973) estudiados en presencia de etanol. Contrariamente a estos resultados en E.coli, Chang, Siddhikol y Weisblum (1969) encontraron que esparsomicina era un buen inhibidor de la interacción de cloranfenicol con ribosomas de B. Stearothermophilus. Esta diferencia no debe ser atribuida al solvente orgánico pues Contreras (1973) encontró en su ausencia, idénticos resultados (siempre en E.coli). Esta introducción acerca del mecanismo de acción de este antibiótico no debe concluir sin situarlo en el contexto general del modo de acción de otros inhibidores. Si bien la hipótesis establecida por Monro y cols. (hoy generalmente aceptada) lo sitúa en un lugar enteramente particular, no hay que olvidar que otros inhibidores, tales como gougerotina poseen un efecto cualitativamente similar (aunque cuantitativamente muy inferior), especialmente en los sistemas de fijación de fragmento acetilado (Monro, Celma y Vázquez, 1969) y de Ac-Fen-tRNA en ausencia de mensajero (Jiménez, Monro y Vázquez, 1970). Recientemente se ha establecido (Contreras, Barbacid y

Vázquez, 1973) que, tianfenicol, un derivado de cloranfenicol, se comporta de forma similar en los ensayos anteriormente descritos incluso desde un punto de vista cuantitativo. No obstante la interacción de este último con el ribosoma no se ve afectada por esparsomicina. Los resultados obtenidos estudiando el efecto de este antibiótico sobre la fijación de ^3H anisomicina, ^3H gougerotina y ^{14}C tricodermina se presentan a continuación. Figura V.7 pone de manifiesto un comportamiento diferencial entre los ribosomas de levadura y humanos al estudiar la fijación de ^3H anisomicina. En los primeros, se alcanza rápidamente una inhibición parcial (30-35%) a concentraciones muy bajas del antibiótico (10^{-7} - 10^{-6} M) lo que concuerda con su alta afinidad deducida de los experimentos descritos anteriormente y en los que generalmente se encuentran efectos saturantes a 10^{-5} M. A partir de 3×10^{-6} M no se producen mayores inhibiciones hasta concentraciones superiores a 0,5 mM donde una segunda inhibición comienza a hacerse patente. Esta situación se corresponde perfectamente con una acción inhibidora de esparsomicina sobre la fijación de ^3H anisomicina, pero tan solo en un cierto porcentaje de ribosoma. Se hicieron cálculos con objeto de correlacionarlos con los ribosomas de alta ó baja afinidad (IV.1.3) pero el tanto por ciento de inhibición no se correspondió con el experimental. Esto no descarta que esparsomicina solo interaccione con ribosomas (en un sitio exclusivo con anisomicina) de uno u otro tipo pero en proporciones distintas. Pestka y cols. (1972) han mostrado que en su sistema de síntesis de peptidil- ^3H puromicina cataliza-

da por polisomas de hígado (ó cerebro) de rata, anisomicina y esparsomicina son los únicos inhibidores competitivos de puromicina en esta reacción. Sin embargo estos resultados obtenidos con ribosomas de levadura no se corresponden con los de mamíferos (procedentes de amígdalas palatinas humanas) pues en este caso (Fig. V.7, ■ --- ■) solo hay una pequeña inhibición a concentraciones superiores a 10^{-5} M. Un comportamiento similar fué encontrado al estudiar su efecto sobre la fijación de ^{14}C tricodermina a ribosomas, incluso de levadura. La explicación a este diferencial comportamiento es desconocido en el presente momento.

Por lo que respecta a la fijación de ^3H gougerotina, esparsomicina a 10^{-4} M inhibe completamente (96%) su interacción con el ribosoma eucariótico de levadura (Tabla V.2). Este resultado es muy interesante, no solo porque correlaciona la fijación de estos inhibidores que según se ha dicho anteriormente, algunos autores han encontrado cierto paralelismo entre sus modos de acción, sino porque demuestra que esparsomicina interacciona con todos los ribosomas (al menos con todos los que lo hacen con gougerotina, 85%) por lo que el resultado obtenido con ^3H anisomicina no puede ser explicado por una interacción total anisomicina-esparsomicina en la que este último solo interaccionara con un determinado porcentaje de ribosomas, habiéndose de admitir una situación mas compleja tal como heterogeneidad ribosómica.

Este ensayo se realizó con ribosomas 70S de E.coli estando, al igual que antes esparsomicina 10^{-4} M y ^3H gou-

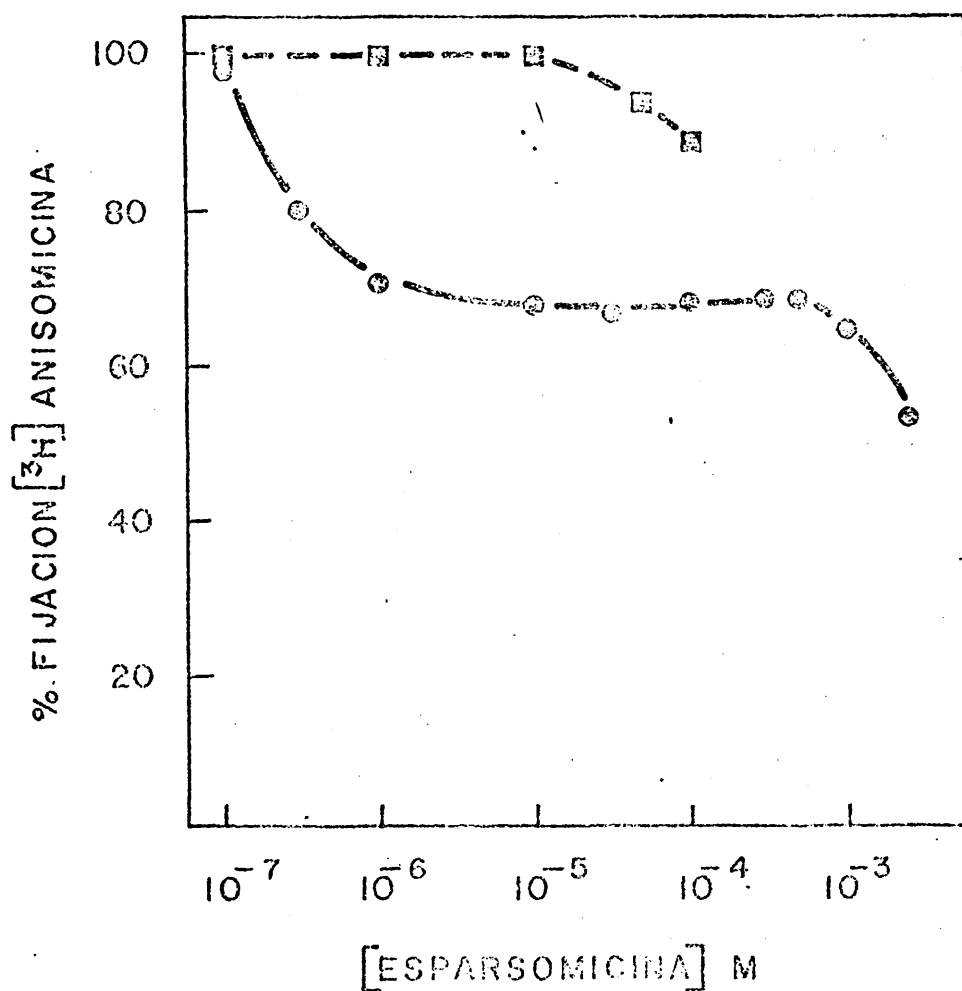


FIG.7. Efecto de esparsomicina sobre la fijación de ^3H anisomicina.

- --- ■ ribosomas de amígdalas palatinas humanas
- — ● ribosomas de levadura

Condiciones experimentales: 0°C , 10^{-6} M de ^3H anisomicina y $3,5 \times 10^{-6}$ M (BFH) y $2,5 \times 10^{-6}$ M, (BFY) de ribosomas, respectivamente.

gerotina 10^{-6} M. La inhibición fué tan solo de un 86% (Tabla V.2). Así parece quedar establecida la relación existente entre los sitios de fijación de gougerotina y esparsomicina lo que concuerda con los resultados obtenidos por otros autores tal y como se ha descrito anteriormente.

V.1.6. OTROS INHIBIDORES DE PEPTIDIL TRANSFERASA ACTIVOS EN SISTEMAS PROCARIOTICOS Y EUCARIOTICOS.

Tal y como se indicó al comienzo de este capítulo, el encabezamiento se refiere tan solo a inhibidores activos en formación de enlace peptídico. En este apartado se incluyen los antibióticos:

Blasticidina S y Amicetina. - Estos dos inhibidores, junto con gougerotina, pertenecen al grupo de los denominados aminohexosa nucleósidos de pirimidina. Una revisión concerniente a sus estructuras y modo de acción fué hecha en 1970 por Suhadolnik.

Su modo de acción es muy similar ó idéntico al de gougerotina (ver Introducción). Sin embargo y como norma general, amicetina es mas activo en sistemas procarióticos, mientras que blasticidina S parece serlo en los eucarioticos. Ambos antibióticos inhiben la formación de enlace peptídico según la reacción de la puromicina a partir de Ac-Fen-tRNA (Pestka, 1970a). También inhiben la reacción del fragmento en sistemas procarióticos (Monro y Vázquez, 1967), mientras que en eucarióticos, amicetina produce tan solo peque-

ñas inhibiciones a concentraciones muy elevadas, siendo mucho mas activo cuando se ensaya la reacción con subunidades 60S (Battaner y Vázquez, 1971a). Al igual que esparsomicina, aunque en menor extensión, estimulan la fijación del fragmento donador CACCA-Leu-Ac en presencia de etanol (Celma, Monro y Vázquez, 1970) e inhiben la "reacción de la esparsomicina" (Monro, Celma y Vázquez, 1969), de donde puede deducirse, tal y como se hizo para gougerotina, una estrecha relación entre esta familia de antibióticos y esparsomicina (ver apartado anterior). Ninguno de los dos posee efecto sobre la fijación de fenilalanil-tRNA a ribosomas en presencia de poli U. Al igual que con gougerotina, Pestka (1972a) ha reportado una inhibición de tipo mixto sobre la formación de peptidil-³H puromicina con polisomas de E.coli para ambos inhibidores.

Finalmente y por lo que se refiere a su interacción con ribosomas, Kinoshita, Tanaka y Umezawa (1970) tras aislar ¹⁴C blastidina S del caldo de cultivo, han determinado una constante de disociación a 0°C de 2×10^{-6} M. utilizando ribosomas de E.coli, siendo la estequiometría de la interacción 1:1. Su fijación solo se vió afectada por gougerotina mientras que cloranfenicol, lincomicina, eritromicina y puromicina no tenían efecto (amicetina y esparsomicina no fueron ensayados). Por lo que respecta a amicetina no se ha podido estudiar su interacción directa con el ribosoma debido a su estructura mas compleja, lo que ocasiona dificultades a la hora de ser obtenida en forma radioactiva (ver Discusión). Sin embargo se sabe que no afecta la fijación

de cloranfenicol a ribosomas de E.coli (Vázquez, 1966) mientras que tal y como sucedió con esparsomicina Chang y cols. (1968) detectaron un resultado positivo (60% de inhibición) cuando los ribosomas de E.coli fueron sustituidos por los de B.stearothermophilus.

Los resultados presentados en esta Tesis concuerdan con los obtenidos por Kinoshita y cols. puesto que blastidina S se comporta como inhibidor total a 10^{-4} M de la fijación de ^3H gougerotina tanto a ribosomas procarióticos (E.coli) como eucarióticos (S.cerevisiae) (Tabla V.2). Por el contrario, amicetina (10^{-4} M frente a 10^{-6} M de ^3H gougerotina) se mostró como un inhibidor parcial. Si bien el 40% de inhibición obtenido en el caso de ribosomas 80S podría haber sido explicado considerando el menor efecto que este antibiótico posee en este tipo de ribosomas, el 26% de inhibición obtenido con ribosomas 70S no puede ser interpretado de ninguna forma, no coincidiendo además con todos los resultados anteriormente descritos acerca del paralelismo entre el modo de acción de gougerotina, blastidina S y amicetina.

Finalmente y al igual que sucedió con gougerotina, ninguno de estos dos inhibidores posee efecto sobre la fijación de ^3H anisomicina y ^{14}C tricodermina al ribosoma eucariótico (Tabla V.4).

Puromicina. Es el antibiótico de modo de acción mas universalmente conocido debido a su empleo como análogo del

extremo 3' aminoacil adenosina del sustrato aceptor del enzima peptidiltransferasa. Su mecanismo de acción consiste en reaccionar con el peptidil-tRNA, liberando las cadenas polipeptídicas nacientes. La definición de los sitios ribosómicos, sitio del peptidil ó sitio P y sitio del aminoacil-tRNA ó sitio A, según que un sustrato sea capaz ó no de reaccionar con puromicina, conserva plena vigencia y es raro el trabajo sobre síntesis de proteínas que no utilice de una u otra forma este antibiótico. Una detallada revisión de su modo de acción ha sido recientemente publicada por Pestka (1971). Su fijación a ribosomas de *E. coli* en las condiciones de la reacción del fragmento ha sido recientemente estudiada por Fernández-Muñoz y Vázquez (1973b). Centrándonos en el tema que interesa en este capítulo, solo esparsomicina produce 100% de inhibición. El grupo de los aminoglicosídicos no fué ensayado.

En los sistemas descritos en esta Tesis, puromicina no produce ningún efecto a 10^{-4} M, sin embargo a concentraciones crecientes hasta 10 mM provoca inhibiciones parciales en un mayor ó menor grado que no deben ser tenidas muy en cuenta puesto que no se corresponden con la fijación responsable de su modo de acción.

Así su mayor efecto lo ejerce sobre anisomicina donde llega a provocar hasta un 50% de inhibición en ribosomas de levadura a 0°C, cuando se encuentra en la proporción 5000 a 1, esto es 5 mM. Este efecto es similar, aunque ligeramente inferior, con ribosomas humanos (Tabla V.5).

En el caso de ^{14}C tricodermina este ensayo ha sido realizado tan solo con ribosomas 80S de *S.cerevisiae* encontrándose una inhibición parcial al igual que con ^3H anisomicina.

Finalmente se muestra como debil inhibidor de la fijación de ^3H gougerotina, tanto a ribosomas procarióticos como eucarióticos. Sin embargo su efecto es mas acentuado en estos últimos, puesto que siendo en ambas casos la afinidad de gougerotina muy similar (IV.2.3), puromicina 2 mM causa un 49% de inhibición, mientras que con ribosomas 70S tan solo es del 15% (Tabla V.2). Por consiguiente puromicina no interacciona directamente con la fijación de ninguno de los antibióticos aquí estudiados, si bien posee ciertos efectos a altas concentraciones cuya significación biológica (si es que la tiene) no es conocida.

Actinobolina. Se trata de un inhibidor de síntesis de proteínas activo en sistemas procarióticos y eucarióticos muy poco conocido (no aparece incluido en ninguna de las revisiones mas actuales sobre inhibidores de síntesis de proteínas, Weisblum y Davies (1968) y Pestka (1971). Smithers, Bennett y Struck (1969) mostraron que actuaba en alguna etapa de la síntesis de proteínas puesto que no afectaba la activación de aminoácidos, encontrando que no inhibía la liberación de peptidos nacientes por puromicina, esto es, formación de enlace peptídico. Contrariamente, Battaner y Vazquez (1971a) han reportado que si bien este antibiótico no posee actividad sobre la fijación de ninguno de los sustratos de peptidil transferasa, ya sean en ensayos con fragmentos

ó con tRNA intacto, es capaz de inhibir moderadamente la formación de enlace peptídico según el ensayo de reacción del fragmento, pero no según la reacción de la puromicina. Esto parece ser debido a un fenómeno de afinidad pues tal y como aparece en la tabla V.2 actinobolina a 10^{-4} M se muestra como un parcial inhibidor de la fijación de ^3H gougerotina a ribosomas 70S de E.coli (41%) y 80S de S.cerevisiae (11%) lo que concuerda con su mayor efecto en sistemas procarióticos. Sin embargo en las condiciones de la reacción del fragmento (FRY) esta inhibición es total en ambos tipos de ribosomas.

A pesar de estos resultados, que sugieren, al menos en las condiciones FRY, un sitio de acción muy relacionado con gougerotina, un mas detallado estudio sobre el modo de acción de este antibiótico debe ser hecho antes de establecer ninguna conclusión definitiva. Finalmente se ha de indicar que no ejerce efecto alguno sobre la interacción de ^3H anisomicina ó ^{14}C tricodermina con ribosomas eucarióticos.

Griseoviridina. Si poco conocido era el mecanismo de acción de actinobolina mucho menos lo es el de este otro antibiótico. Mostrado como activo tan solo en bacterias, se ha comprobado posteriormente que su falta de efecto sobre levaduras u otros organismos superiores pudiera ser debido a impermeabilidad puesto que recientes experimentos hechos en el laboratorio del Dr. Vázquez por L. Carrasco y por mí mismo han mostrado que es un inhibidor de formación de enlace peptídico según la reacción del fragmento (Fig. V.8).

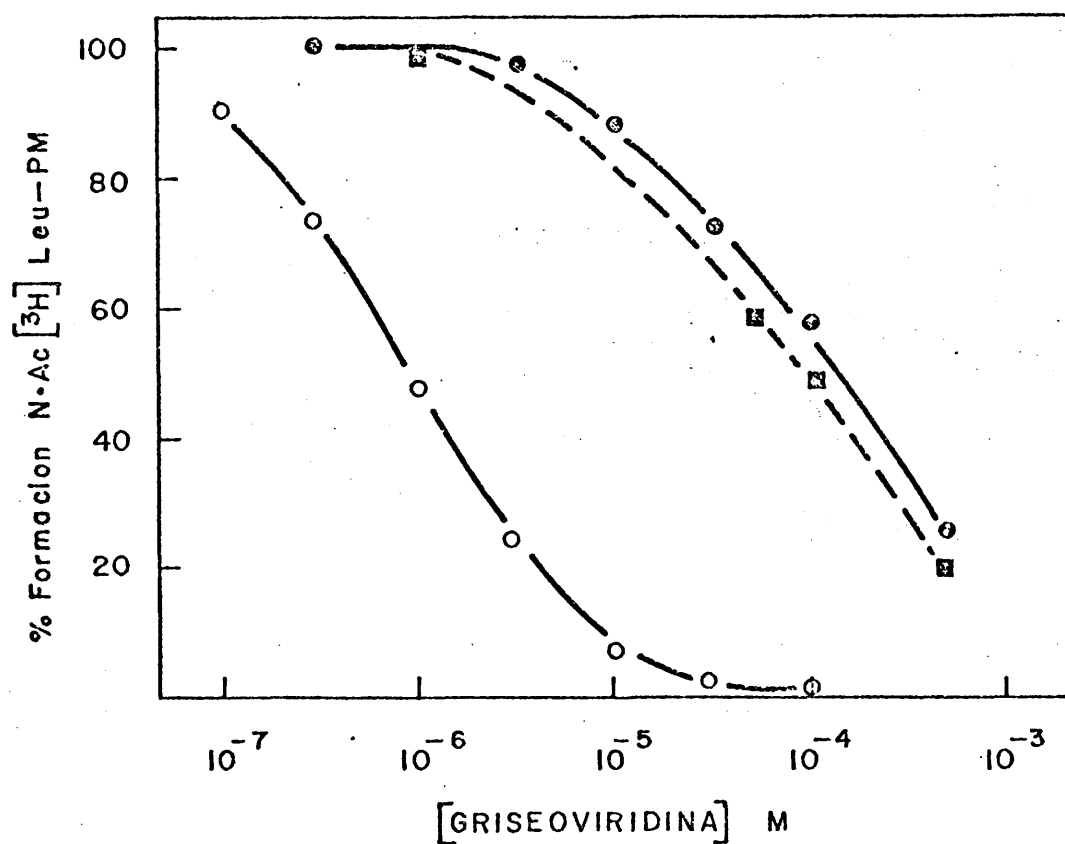


FIG.V.8. Efecto de griseoviridina sobre la reacción del fragmento catalizada por:

- Ribosomas de *E. coli*
- Ribosomas de amígdalas palatinas humanas
- Ribosomas de *S. cerevisiae*

Incubación a 0°C durante 5, 30 y 20 minutos respectivamente.

Sin embargo resulta evidente su pronunciado efecto sobre ribosomas de E.coli (o—o), respecto de los eucarióticos, humanos (■—■) y S.cerevisiae (●---●). La inclusión de este inhibidor en esta Tesis, viene justificada por el resultado obtenido al ensayar su efecto sobre la fijación de ^3H gougerotina a las tres clases de ribosomas (Tabla V.6). En el caso de E.coli, se encontró que una concentración de 10^{-4} M de inhibidor (frente a 10^{-6} M de ^3H gougerotina) provocaba una fijación del 434% respecto del control (334% de estimulación). Paralelos resultados se obtuvieron en el caso de levaduras (175% de fijación) y amígdalas palatinas humanas (185%). La correlación cuantitativa entre estos valores y los de inhibición expresados en la figura V.8 dan una mayor validez a estos experimentos. No obstante su significación biológica permanece desconocida, siendo el primer caso encontrado de estimulación de la fijación de un antibiótico por otro, al menos de esta magnitud. Experimentos con objeto de determinar posibles fenómenos de sinergismo habrán de llevarse a cabo próximamente.

IV.1.7. OTROS INHIBIDORES

a) Inhibidores específicos de sistemas procarióticos. -

Se han ensayado a una concentración de 0,1 mM sobre la fijación de ^3H gougerotina (10^{-6} M) (ver Tabla V.2). Clo-ranfenicol ó tianfenicol no ejercen efecto alguno lo que concuerda con el efecto inverso detectado por Fernández-Muñoz y cols. (1971) y Contreras y cols. (1973). Análogos

resultados se obtuvieron con el grupo de los macrólidos, de los que se ensayaron tres de sus más característicos representantes: eritromicina, espiramicina III y oleandomicina. El grupo de las estreptograminas A (Vazquez, 1967), si bien tan solo representado por vernamicina A, produjo una ligera estimulación del 30% respecto del control. Por el contrario viridogriseina que puede considerarse como perteneciente al grupo B de estos antibióticos, provocó una inhibición (35%) que se vió fuertemente incrementada en las condiciones de la reacción del fragmento (76%). Por último, lincomicina resultó enteramente inefectiva. Esto contrasta con la similitud estructural que Smithers y cols. (1969) quisieron atribuir a este antibiótico con actinobolina.

b) Inhibidores específicos de sistemas eucarióticos. -

Ya se han descrito las interacciones entre los tres únicos inhibidores de formación de enlace peptídico específicos para ribosomas 80S, conocidos hasta el momento (Tabla V.4). Haciendo una excepción, al igual que en (a) acerca de las características de los antibióticos estudiados en este capítulo (respecto a su efecto sobre formación de enlace peptídico), se ensayaron los inhibidores cicloheximida, sobre la fijación de ^3H anisomicina y ^{14}C tricodermina y criptopleurina, sobre ^3H anisomicina, no encontrándose ningún efecto.

c) Otros reactivos. - Análogos resultados se obtuvieron al ensayar el efecto de N-etil-maleimida (1 mM), un inhibidor de grupos sulfidrilo, sobre la fijación de ^3H anisomi-

cina a ribosomas de levadura lo que parece estar de acuerdo con el nulo efecto de este reactivo sobre el centro peptidil transferasa del ribosoma.

Referencias sobre el modo de acción de los inhibidores tratados en este apartado pueden ser obtenidas de la revisión publicada en 1971 por S. Pestka en *Annual Review of Microbiology*.

CAPITULO VI

DISCUSION

La identificación y medida de un compuesto, ya sea macromolecular o de bajo peso molecular, es en definitiva lo que va abriendo poco a poco la posibilidad de conocer como ocurren los procesos bioquímicos a nivel molecular. Tomando como referencia la biosíntesis de proteínas, el desarrollo de ciertos ensayos específicos ha permitido estudiar la mayor parte de los componentes implicados en este proceso. Reacción del fragmento para peptidil transferasa, empleo de GDPCP o ácido fusídico mas GDP para el factor de polimerización G, hidrólisis de formil-metionina para los factores de terminación etc., son ensayos que permiten localizar e identificar fácilmente estas macromoléculas allí donde se encuentren, a partir de compuestos radioactivamente marcados de fácil adquisición en casas comerciales. Sin embargo existen procesos mas complicados, como la iniciación, donde el acoplamiento entre la función de los factores es tal que no existen ensayos específicos para cada uno de ellos. Es entonces cuando hay que recurrir a su observación directa. Hoy en día, tal medida o localización, dados los niveles cuantitativos en que se trabaja, solo puede llevarse a cabo mediante el empleo de isótopos radioactivos. Volviendo sobre el ejemplo anterior, el conocimiento actual de la función de los factores de iniciación ha sido solo posible cuando se han preparado en forma radioactiva (Sabol y Ochoa, 1971; Benne y cols. 1972 y 1973). No es necesario encontrarnos ante situaciones tan complejas para sentir la necesidad de un compuesto en forma radioactiva, basta que en el ensayo, por muy simple que sea, se

TABLA VI.1

ANTIBIOTICOS ISOTOPICAMENTE MARCADOS

METODOS DE OBTENCION

| | | | |
|---------------|---------------|------|-----------------|
| QUIMICOS | TOTAL | | Cloramfenicol |
| | PARCIAL | | Tricodermina |
| | DERIVADOS | | Dihidrofusídico |
| | | | |
| BIOSINTETICOS | | | Eritromicina |
| | | | Lincomicina |
| | | | |
| INTERCAMBIO | MET. WILZBACH | | |
| | | GAS | |
| | CATALITICO | | Anisomicina |
| | | AGUA | Gougerotina |
| | | | Puromicina |

necesite medir alguno de sus componentes en cantidades del orden pico o nanomolar y este no sea comercialmente adquirible, el problema queda de nuevo planteado.

He aquí el caso de la interacción inhibidor-ribosoma. Una vez estudiados (profusamente estudiados) los inhibidores activos en sistemas procarióticos se planteó la necesidad, común a todos los estudios de síntesis de proteínas, de extrapolar estas investigaciones a ribosomas eucarióticos lo que implicaba la existencia en forma radioactiva de algunos de los inhibidores activos en estos sistemas.

Los métodos a seguir son tres en líneas generales: síntesis química, biosíntesis a partir del microorganismo productor e intercambio isotópico (Tabla VI.1). El primero de ellos solo puede ser aplicado en casos muy específicos. La síntesis total presenta problemas químicos de gran envergadura que se ven incrementados por el empleo de isótopos radioactivos por los que solo es aplicable a antibióticos de estructura muy simple y fácilmente sintetizable (cloranfenicol). La síntesis parcial es sencilla cuando se puede llevar a cabo a partir de un derivado que por reacción con un determinado compuesto radioactivamente marcado se obtenga el antibiótico deseado (tricodermina, sección III.3).

Desgraciadamente la aplicabilidad de este método es muy restringida. La síntesis de un derivado es un método idéntico a excepción de que el compuesto de partida es el antibiótico en cuestión y el derivado obtenido debe poseer idéntica actividad biológica (ácido dihidrofusídico): Los mé-

todos biosintéticos (lincomicina y eritromicina) requieren, además de unas instalaciones adecuadas, (1) poseer el microorganismo (cosa no siempre fácil) (2) conocer el precursor y (3) que este se incorpore en proporciones aceptables.

Los métodos de intercambio son los más rudimentarios. Consisten en el intercambio de los átomos de hidrógeno con los del medio, gas (Wilzbach, 1957; Meshi y Takahasi, 1962) o agua (ver III.1.1 y III.2.1). No se requiere ningún conocimiento acerca de la estructura del compuesto a marcar y el éxito de la operación es aleatorio pero es especialmente indicado para compuestos en cuya estructura existan anillos de purina debido a la fácil intercambiabilidad con el medio, del hidrógeno situado en posición 8 (Shelton y Clark, 1967). De los 5 antibióticos que enviaron a The Radiochemical Centre (Inglaterra) para ser sometidos a este proceso (amicetina, anisomicina, blasticidina S, ácido fusídico y gougerotina) tan solo las preparaciones de anisomicina y gougerotina contenían el antibiótico tritiado (secciones III.1 y III.2). Con este método solo puede preverse que cuanto mayor sea la estabilidad y la simplicidad estructural del compuesto, mayores posibilidades existen de recuperarlo en forma radioactiva, al menos en una proporción apreciable. Lógicamente este método de intercambio (preferentemente en medio acuoso mediante la presencia de un catalizador adecuado) solo debe ser aplicado tras agotar las posibilidades anteriormente mencionadas, tanto por la

inseguridad de su resultado final como por lo costoso del proceso de purificación del crudo radioactivo cuyo desarrollo ha sido ampliamente descrito y razonado a medida que se iban describiendo las etapas puramente preparativas a lo largo del Capítulo III. Por el ello no creo necesario hacer mas incapié en esta parte de la Tesis a excepción de la necesidad de obtener los compuestos 100% puros por múltiples y variados criterios, única garantía de seguridad respecto de los resultados que posteriormente hayan de obtenerse a partir de estos compuestos.

Los estudios de fijación desarrollados en esa Tesis aportan:

a) Cálculo de la interacción de ^3H anisomicina (en distintas condiciones) con ribosomas (y subunidades) de levadura humanos; interacción de ^{14}C tricodermina con estos mismos tipos de ribosomas y de ^3H gougerotina con ribosomas del tipo 70S o procarióticos (E.coli) y 80S eucarióticos (S.cerevisiae) así como con sus correspondientes subunidades (si bien de una forma semicuantitativa).

b) Poner de manifiesto una heterogeneidad ribosómica, característica exclusivamente demostrada por estos métodos en las partículas eucarióticas.

c) Localizar y determinar los sitios de acción de los tres antibióticos isotopicamente marcados.

d) Relacionar dichos sitios de fijación con la interacción del resto de los inhibidores de peptidil transferasa

con los ribosomas.

Los apartados a) y d) han sido suficientemente discutidos en los capítulos correspondientes de Resultados. Los valores de las afinidades han sido en todo momento referidos, no como valores absolutos sino comparados a aquellas otras interacciones de magnitud conocida. Además en el Apéndice IV se puede encontrar una lista con todos los valores numéricos de las constantes de disociación y de saturación determinados en esta Tesis. Esta discusión quedará centrada sobre el problema de la heterogeneidad ribosómica y el mecanismo íntimo de acción de estos inhibidores.

Ha quedado establecido que los ribosomas eucarióticos obtenidos a partir del extracto celular segun técnicas convencionales, presentan una diferencia en la capacidad para interaccionar con ciertos antibióticos (anisomicina y gougerotina) mientras que frente a otros aparecen totalmente homogéneos (tricodermina). La interpretación de este fenómeno se complica por el hecho de que mientras tricodermina y anisomicina (homo y heterogeneidad respectivamente) son inhibidores competitivos, anisomicina y gougerotina interaccionan en sitios ribosómicos totalmente independientes. La homogeneidad presentada por los ribosomas procarióticos frente a gougerotina excluye cualquier posible sugerencia acerca de localización del fenómeno en la preparación del antibiótico. Así la heterogeneidad de los ribosomas eucarióticos detectada en esta Tesis es un hecho

incontroversible.

Los experimentos realizados con subunidades (IV.1.4) que han puesto de manifiesto una implicación directa de la subunidad menor 40S a pesar de que el sitio de acción de anisomicina se encuentra sobre la subunidad 60S, entroncan nuestros resultados con la actual visión del ribosoma procariótico (Kurland, 1972; ver Introducción). Es esta la primera evidencia presentada en eucarióticos de la existencia de dos tipos de subunidades 40S (ver mas adelante) localizadas en el ribosoma intacto, puesto que otros autores (Wettenhall y cols. 1973 y referencias allí citadas) han reportado diferencias, mas físicas que de actividad, pero de subunidades aisladas lo que presenta la posibilidad de que tales resultados dependan del método de obtención. En realidad los experimentos presentados en esta Tesis no demuestran la existencia de dos tipos de subunidades 40S, sino que pudiera tratarse de una sola subunidad 40S y dos formas distintas de interaccionar con la 60S. La "señal" para que la interacción ocurra de una forma u otra pudiera estar localizada en cualquier de ambas subunidades.

El principal problema planteado emerge del significado fisiológico de la heterogeneidad ribosómica. Dos hipótesis pueden ser consideradas: (1) En la célula eucariótica existen dos tipos de ribosomas, unos activos en síntesis de proteínas que se corresponderían con los ribosomas de alta afinidad (28%), puesto que quedó demostrado que estos eran los que poseían actividad peptidil transferasa (IV.1.5 y 6),

mientras que el resto (60%) estaría implicado en procesos metabólicos, pues dado que las levaduras fueron recogidas en fase logarítmica de crecimiento no hay una reserva ribosómica. (2) Estas diferencias corresponden a dos estados que puede adoptar el ribosoma dentro de las etapas de crecimiento de la cadena peptídica y que provocan un cambio tal en la conformación ribosómica que puede ser detectado en cuanto a su afinidad por anisomicina o gougerotina. Es muy posible y en la actualidad generalmente admitido, que el ribosoma posea una conformación distinta para cada una de las etapas que han de repetirse a lo largo de los ciclos de polimerización así como en los procesos de iniciación, terminación y etapas no polisómicas. No obstante, la evidencia existente para lanzar este modelo dinámico del ribosoma se reduce a sistemas procarióticos puesto que muy poco es conocido acerca de la estructura del ribosoma eucariótico y aun manteniendo un paralelismo entre ambos, resulta evidente que esta situación de heterogeneidad debería haber sido encontrada con ribosomas 70S de E. coli.

Se ha de tener presente que los ribosomas tal y como han sido obtenidos en esta Tesis no se encuentran unidos al mensajero sino como ribosomas libres por lo que no existe "a priori" ninguna razón por la que hayan de conservar la conformación que tenían dentro de la célula. En realidad un cambio conformacional deberá desaparecer cuando cese la causa que lo ha provocado, esto es, si un ribosoma en estado postranslocado (peptidil-tRNA en el sitio P) es distinto de un ribosoma pretranslocado (peptidil-tRNA en

el sitio A), al desaparecer el peptidil-tRNA ambos ribosomas serán indistinguibles. He aquí una posible explicación para la diferencia encontrada entre ribosomas procarióticos y eucarióticos, pues es generalmente admitido que el peptidil-tRNA o bien el tRNA deacilado forman complejos mucho mas estables con los últimos que con los primeros. Esto explicará el hecho de que la heterogeneidad ribosómica se mantenga aun después de obtenidas las subunidades (el tRNA deacilado puede continuar en parte unido al ribosoma después de este proceso). Es conocido (Modolell y cols. 1973; Nombela y Ochoa, 1973) que la deacilación del tRNA, situado en el sitio P (formación de enlace peptídico) provoca un cambio conformacional tal en el ribosoma, que permite la entrada del factor EF G pero no la del EF T, situación inversa a la existencia cuando todavia existe el peptidil-tRNA como tal, en el sitio donador.

Por lo que a la fijación de anisomicina se refiere, la posible presencia de ese factor condicionante de una determinada estructura ribosómica no repercute directamente sobre la subunidad 60S (tomando siempre como criterio la interacción con el antibiótico) sino sobre la interacción entre ambas subunidades, es decir sobre el ribosoma completo.

A partir de estas consideraciones podría pensarse que los ribosomas de baja afinidad son aquellos que poseen tRNA deacilado en el sitio P, es decir, que acaban de formar enlace peptídico. Tales ribosomas serían inactivos en dicha reacción al igual que lo son los de baja afinidad (IV.

1.5). Es conocido que el tRNA posee una mayor afinidad por el sitio P y que tan solo se fija al A cuando aquel esta ocupado. Otro punto interesante a considerar es que los lavados con alta concentración de sales amónicas eliminan de forma prácticamente completa el residuo peptídico. Así la obtención de subunidades o la mera disociación del ribosoma habrían de provocar una cierta eliminación de este tRNA deacilado lo que redundaría en un incremento de la proporción de ribosomas de alta afinidad lo cual se pone de manifiesto en los experimentos expresados en las figuras IV.6 y 7. El hecho de que sea en este último caso cuando el incremento es mayor es tan solo aparente, pues un 35% de ribosomas de alta afinidad obtenido tras la preparación de subunidades y posterior reasociación, representa respecto del total de ribosomas activos, una proporción mas elevada que el 36% del experimento descrito en la figura IV.7B y por supuesto que el 28% del experimento standard. No obstante estas hipótesis requieren una base experimental.

Como resolver este problema?. Existen varias posibilidades, siendo siempre el factor limitante las consideraciones técnicas debido a la gran cantidad de material necesario para estos experimentos. Así, trabajando en un sistema, tal que la extracción de los componentes intracelulares produjera pocas alteraciones en su estado (lisis de reticulocitos) podría eliminarse una de las dos hipótesis anteriormente trazadas sin mas que comprobar si esta situación presentada por la fracción ribosómica total en la célula no

lo era por la fracción polisómica. La posibilidad de que anisomicina o gougerotina pudieran distinguir entre dos estados ribosómicos de esta fracción es suficientemente sugestiva como para intentar resolver esta incógnita.

Admitiendo la existencia de ese factor condicionante de la heterogeneidad eucariótica podría sugerirse un deficiente lavado de los ribosomas que provocara su eliminación en una determinada población pero no en otra, mientras que el lavado fuera total para el tipo 70S. Esta posibilidad debe ser excluida debido a la perfecta constancia de los resultados encontrada a lo largo de todas las preparaciones ribosómicas ensayadas, lo que refleja una situación real y no una parcial o deficiente manipulación preparativa.

Otro aspecto interesante a deducir del efecto que la interacción de la subunidad 40S con la 60S provoca en su afinidad por anisomicina ($K_{d1}^R = 5,7 \times 10^{-7}$ M frente a $K_d^{60S} = 1,7 \times 10^{-6}$ M, amén del fenómeno de heterogeneidad) (ver figuras IV.5 y 6) es la relación de la menor de las subunidades con el centro activo peptidil transferasa, lo que concuerda con otras observaciones llevadas a cabo por otros grupos de investigadores (Berman y Monier, 1971) (Vogel, Zamir y Elson, 1969) acerca de la influencia de la subunidad menor 30S sobre la formación de enlace peptídico, cuyo máximo exponente puede ser considerado el modelo ribosómico de Spirin (1969) en que sitúa este centro activo en aquella zona de la subunidad 50S que interacciona con la 30S repartiendo entre ambas la localiza-

ción de los sitios ribosómicos P y A respectivamente.

Otro problema a considerar es la pequeña fracción de ribosomas activos existentes en las preparaciones "in vitro". Este fenómeno puesto de manifiesto aún en sistemas procarióticos, adquiere magnitudes alarmantes en eucarióticos. No es extraño encontrar publicaciones donde los trabajos han sido llevados a cabo con poblaciones de ribosomas activos tan solo en un 5-15% aún en ensayos tan simples como fijación de aminoacil-tRNAs (suponiendo complejos equimoleculares). En los experimentos descritos en esta Tesis aparece claramente demostrado en IV.1.6 que como máximo, solo aquellos ribosomas capaces de fijar anisomicina en las condiciones de la reacción del fragmento según K_d^{EtOH} (41%) son activos en este ensayo, adicional evidencia aporta el hecho de que verrucarina A, un potente inhibidor de la reacción del fragmento catalizada por ribosomas de levadura, solo es capaz de interaccionar en estas condiciones con un 35% de los ribosomas, según se deduce de la inhibición de la fijación de ^{14}C tricodermina (V. 1.3). Estos resultados concuerdan con los de Celma (1971) y Harris y Pestka (1973) mostrando que los fragmentos 3' terminales de aminoacil-tRNA interaccionan con una fracción mínima de ribosomas (10-12%) según experimentos auténticamente cuantitativos.

Un punto a considerar y que aportaría mucha luz acerca de las diferencias estructurales de los dos tipos de

ribosomas puestos de manifiesto en esta Tesis sería su separación física. Hasta el presente momento solo se ha conseguido, en cantidades apreciables, separar físicamente subunidades nativas de ribosomas nativos y de la fracción polisómica habiéndose encontrado entre estos componentes diversas diferencias estructurales así como funcionales (ver Introducción). Sin embargo la separación de ribosomas activos en ciertas funciones de los no activos, presenta problemas técnicos de carácter cuantitativo. Se requiere la aplicación de nuevas técnicas para solventar este problema. La cromatografía por afinidad presenta un gran provenir. Si pudieran fijarse a soportes sólidos ciertas moléculas que interaccionen diferencialmente con los ribosomas (principalmente por su mayor sencillez estructural, aminoacil-tRNA) podrían separarse y aislarse aquellos ribosomas activos en esta fijación y con ello lograr (1) determinar las diferencias estructurales entre ribosomas (o subunidades) "activos" e "inactivos", (2) trabajar con poblaciones ribosómicas homogéneas y 100% activas. Esta técnica aplicada a la interacción anisomicina-ribosoma está siendo actualmente considerada en cuanto a la posibilidad de su aplicación.

Anisomicina, gougerotina y tricodermina interaccionan equimolecularmente con el ribosoma en una determinada región de poca variabilidad frente a las condiciones iónicas del medio, a pesar de que gougerotina tiene un sitio de fijación completamente independiente al de los otros dos, lo que im-

plica una interacción de tales antibióticos con un centro común, peptidil transferasa, de poca flexibilidad estructural dada su poca dependencia de las condiciones iónicas del medio. Esto concuerda con el nulo carácter regulador que la etapa de formación de enlace peptídico posee dentro del contexto general de síntesis de proteínas. De esta forma se pone de manifiesto una estrecha relación entre procesos regulatorios. Tales como iniciación, entrada de factores de polimerización etc. con cambios conformacionales en el ribosoma mientras que una característica de rigidez parece presidir aquellas situaciones en que el ribosoma se comporta como una partícula inerte.

Por lo que respecta a gougerotina fué propuesto un mecanismo de acción que consistía en una inhibición de la fijación del extremo 3'terminal (CCA) del aminoacil-tRNA basándose en la similitud estructural existente entre gougerotina y citidina. (Coutsogeorgopoulos, 1967; Černá, Lichtenhaler y Rychlik, 1971). Esta hipótesis se apoyaba además en la inhibición por gougerotina de la fijación del fragmento aceptor, pero no del aminoacil-tRNA lo que justificaba su único efecto sobre el extremo CCA final (ver Introducción). Sin embargo, recientemente Harris y Pestka (1973) han desarrollado un sistema para calcular las afinidades de una serie de antibióticos de una forma indirecta a partir de su efecto sobre la fijación de $\text{CACCA}^{14}\text{C}-\text{Fen}$ al ribosoma. En el caso de gougerotina resultó una constante de disociación de $1,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ que frente a $2,1 \times 10^{-6} \text{ M}$ (K_d para

20% de etanol) determinado por nosotros por medida directa de fijación, pone de manifiesto una disparidad de 50 veces. El número de sitios por ribosoma fué idéntico, 0,73 frente a 0,70. Estos resultados ponen de manifiesto que gougerotina afecta de algún modo la fijación del extremo CCA terminal del aminoacil-tRNA. Sin embargo esta interacción se produce de forma indirecta y como consecuencia del efecto de gougerotina sobre la formación de enlace peptídico tal y como quedó demostrado en el apartado IV.2.5 mediante la correlación de los valores de K_d^{70S} y la inhibición provocada sobre la reacción de la puromicina ensayada a 0°C , pero no existe una competición directa entre gougerotina y cualesquiera de los dos residuos citidílicos 3' terminales del tRNA, al menos según este tipo de ensayo.

Asimismo anisomicina y tricodermina producen un efecto directo sobre la formación de enlace peptídico. No obstante su interacción provoca una distorsión en el centro activo peptidil transferasa que se ve reflejada por la parcial inhibición que estas drogas provocan sobre la fijación de fragmentos 3' terminales del tRNA como sustratos (Battner y Vázquez, 1971a) (Carrasco y cols. 1973).

Gougerotina, según se desprende de los experimentos presentados en IV.2.4 puede ser un magnífico útil de trabajo a la hora de determinar la asociación entre las subunidades ribosómicas. Tal y como se ha demostrado en esta Tesis, gougerotina es capaz de discernir entre diversos grados de asociación del ribosoma dependiendo de la presencia

de tRNA deacilado o de productos eliminados del ribosoma cuando este se disocia en sus subunidades. De esta forma se podría determinar, de acuerdo a Vournakis y Rich (1971 y 1972) si la estructura de los ribosomas nativos se corresponde o no con la de los ribosomas polisómicos. Siempre hay que tener en cuenta que la concentración de macromoléculas es muy superior en estos ensayos de fijación a la que debe existir en la asociación 30S·50S dentro de la bacteria por lo que es muy posible que la situación final no sea la misma. Tal y como sucede en multitud de ensayos, la correlación "in vivo" "in vitro" debe ser tomada con grandes precauciones.

La temperatura (30°C) produce una disminución de afinidad de los antibióticos por el ribosoma. Este fenómeno parece ser general; sin embargo en el caso de gougerotina y especialmente en ribosomas eucarióticos esta disminución es dramática, K_d^{80S} (30°C) estimada alrededor de 4×10^{-4} M. Los resultados presentados por Pestka y cols (1972) en su sistema de liberación de péptidos nacientes por ^3H puromicina revelan una afinidad para este antibiótico de una magnitud un orden superior. Esto puede deberse, tanto a la menor temperatura empleada en este ensayo (24°C) como a la gran sensibilidad que presenta la afinidad de gougerotina por los distintos estados de asociación ribosómicos, según se ha demostrado en esta Tesis.

Las relaciones existentes entre los sitios ribosómicos de fijación de los inhibidores de formación de enlace peptí-

dico han sido suficientemente detalladas en el Capítulo V. Por ello me limitaré a resumirlas brevemente: (a) Existencia de una región común al ribosoma procariótico y eucariótico donde se fijan los inhibidores activos en ambos sistemas interaccionando entre sí de forma mas o menos efectiva. (b) Existencia de una región específica del ribosoma eucariótico, independiente de la anterior, donde tienen su sitio de fijación, exclusivo, los inhibidores del centro activo peptidil transferasa eucariótico. (c) Diferencias estructurales entre los ribosomas eucarióticos detectadas en cuanto a su afinidad por el ácido tenuazónico (d) Heterogeneidad ribosómica para otros antibióticos distintos de anisomicina y gougerotina, tales como verrucarina A y posiblemente esparsomicina.

El estudio estructural llevado a cabo con anisomicina obedeció tanto a la oportunidad que su sencillez química proporcionaba como al auge que en aquellos momentos tomó la técnica del marcaje por afinidad, tanto para la identificación de las estructuras responsables de la fijación de antibióticos como para sustratos de peptidil transferasa (ver Introducción). El alto grado de inespecificidad obtenido por Bald y cols. (1972) en cuanto a la fijación covalente de un derivado monobromado de cloranfenicol y especialmente, en el caso de un derivado monoiodado de puromicina (Pongs, 1973, comunicación personal) nos sugirió que antes de realizar este tipo de ensayos era necesario asegurarse que el grupo reactivo se encontrara en una estructura responsable de

la interacción inhibidor-ribosoma tal y como ha quedado demostrado para el grupo acetato que esterifica el grupo hidroxilo en posición 3 del anillo pirrolidínico de anisomicina (IV.1.3). Sin embargo los contradictorios resultados obtenidos por Pongs y cols. (1973) y Sonenberg y cols. (1973) usando el mismo compuesto, y el elevado número de proteínas marcadas en los experimentos de Kuechler y Czer-nilofsky (1973) junto con las dificultades de carácter químico que presenta la síntesis del compuesto 2p-metoxifenilmetil-3 α -bromoacetoxi-4 hidroxipirrolidina en forma radioactiva nos han decidido posponer estas experiencias de fijación covalente de anisomicina a ribosomas eucarióticos. Por otra parte, la carencia de una coherente identificación de las proteínas ribosómicas eucarióticas (Bielka y cols. 1972) y el parco conocimiento que de estos ribosomas se tiene actualmente no han permitido atribuir funciones específicas a componentes subribosómicos (a excepción de las subunidades) lo que determina que este tipo de estudios tenga mas razón de ser en un próximo futuro.

Finalmente en todos los experimentos realizados con ribosomas humanos se ha puesto de manifiesto una correlación total con los fenómenos detectados en ribosomas de levadura lo que permite extrapolar los resultados aquí presentados a todos los ribosomas del tipo 80S o eucarióticos. En este sentido es digno de resaltar de nuevo las diferencias observadas con el ácido tenuazónico que se fija preferentemente a los ribosomas de amígdalas palatinas humanas pero tiene muy reducida afinidad por los ribosomas de levadura.

BIBLIOGRAFIA

- ACHINI, R.; B. MULLER y CH. TAMM, (1971) Chemical Communications, 1971, 405.
- ATTARDI, G. y otros autores, (1972). Animal Ribosomes, Experimental Studies of the Last Five Years. MSS Inf. Corporation. New York.
- AYUSO, M.S. y C.F. HEREDIA, (1967) Biochim. Biophys. Acta, 145, 199.
- AYUSO, M.S. y C.F. HEREDIA, (1968) Eur. J. Biochem. 7, 111.
- BALD, R.; V.A. ERDMAN y O. PONGS, (1972) Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 28, 149.
- BALLESTA, J.P.G.; V. MONTEJO y D. VAZQUEZ, (1971a) Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 19, 75.
- BALLESTA, J.P.G.; V. MONTEJO y D. VAZQUEZ, (1971b) Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 19, 79.
- BALLESTA, J.P.G. y D. VAZQUEZ (1972a) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 3058.
- BALLESTA, J.P.G. y D. VAZQUEZ (1972b) Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 28, 337.
- BALLESTA, J.P.G. y D. VAZQUEZ (1972c) Proceedings 8th FEBS Meeting, (Amsterdam) Vol. 27, p. 281.
- BAMBURG, J.R.; N.V. RIGGS y F.M. STRONG, (1968) Tetrahedron 24, 3329.
- BATTANER, E. (1971) Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca, p. 71.
- BATTANER, E. y D. VAZQUEZ (1971a) Biochim. Biophys. Acta, 254, 316.
- BATTANER, E. y D. VAZQUEZ (1971b) Methods in Enzymology, ed. L. Grossman y K. Moldave, vol. 20, p. 446.
- BEEREBOOM, J.J.; K. BUTLER; F.C. PENNINGTON y J.A. SOLOMONS, (1965) J. Org. Chem. 30, 2334.
- BENNE, R.; R. ARENTZEN y H.O. VOORMA, (1972) Biochim. Biophys. Acta, 269, 304.

- BENNE, R.; F. EBES y H. O. VOORMA, (1973) *Eur. J. Biochem.*, 38, 265.
- BENNE, R.; N. NAAKTGEBOREN; J. GUBBENS y H. O. VOORMA (1973) *Eur. J. Biochem.*, 32, 372.
- BERMAN, M. L. y R. MONIER (1971) *Biochimie* 53, 233.
- BERMEK, E. y H. MATTHAEI (1970) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 351, 1377.
- BICKLE, T. A.; G. A. HOWARD y R. R. TRAUT, (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 4862.
- BIELKA, H.; H. WELFLE; P. WESTERMANN; F. NOLL, F. GRUMMT y J. STAHL, (1972) *Proceedings 7th FEBS Meeting (Varna)*. Vol. 23, p. 19.
- BIRGE, E. A. y C. G. KURLAND (1969) *Science*, 166, 1282.
- BIRGE, E. A. y C. G. KURLAND (1970) *Mol. Gen. Genetics*, 109, 356.
- BOLLEN, A.; J. DAVIES, M. OZAKI y S. MIZUSHIMA, (1969) *Science* 165, 85.
- BOLLEN, A.; A. HERZOG; A. FAVRE; J. THIBAUT y F. GROS, (1970) *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, 11, 49.
- BOWMAN, C. M.; F. E. DAHLBERG; T. IKEMURA, J. KONISKY y M. NOMURA (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 68, 964.
- BRAY, G. A. (1960) *Anal. Biochem.*, 1, 279.
- BROT, N.; W. P. TATE, C. T. CASKEY y H. WEISSBACH, (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. (en prensa).
- BROT, N. y H. WEISSBACH (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49, 673.
- BROWNLEE, C. G.; F. SANGER y B. G. BARRELL, (1967) *Nature*, 215, 735.
- BUSIELLO, E. y M. Di GIROLAMO, (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 312, 581.
- BUTLER, K. (1968) *J. Org. Chem.*, 33, 2136.

- CABRER, B.; D. VAZQUEZ y J. MODOLELL, (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 733.
- CAPPECCHI, M. R. y H. A. KLEIN (1969) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biology 34, 469.
- CARRASCO, L. (1973) Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Madrid.
- CARRASCO, L.; M. BARBACID y D. VAZQUEZ (1973) Biochim. Biophys. Acta, 312, 368.
- CASJENS, S. R. y A. J. MORRIS (1965) Biochim. Biophys. Acta, 108, 677.
- CASKEY, C. T.; A. L. BEAUDET; E. M. SCOLNICK y M. ROSMAN (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 3163.
- CASKEY, C. T.; E. M. SCOLNICK; R. TOMKINS; J. GOLDSTEIN y G. MILMAN, (1969) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biology 34, 479.
- CELMA, M. L. (1971) Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Madrid.
- CELMA, M. L.; R. E. MONRO y D. VAZQUEZ (1970) Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 6, 273.
- CELMA, M. L.; R. E. MONRO y D. VAZQUEZ (1971) Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 13, 247.
- CERNA, J.; F. W. LICHTENTHALER y J. RYCHLIK, (1971) Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 14, 45.
- CLARK, J. M. y A. Y. CHANG (1965) J. Biol. Chem. 240, 4734.
- CLARK, J. M. y J. K. GUNTHER (1963) Biochim. Biophys. Acta, 76, 636.
- Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biology, (1969) Volumen 34.
- CONTRERAS, A.; M. BARBACID y D. VAZQUEZ, (1973) Biochim. Biophys. Acta (en prensa).
- CONWAY, T. W., (1964) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 51 1216.
- COUTSOGEORGOPOULOS, C. (1967) Biochemistry, 6, 1704.

- CRAVEN, G.R. y V. GUPTA (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 1329.
- CRAVEN, G.R.; P. VOYNOW; J. J. S. HARDY y C. G. KURLAND, (1969) *Biochemistry* 8, 2906.
- CUE, A.B. y J. G. H. DIAZ (1961) *Rev. Inv. Biol. Univ. Guadalajara*, 1, 94.
- CHA-MIR, W. y C. S. Mc LAUCHLIN (1973) *Fed. Proceedings*, 32, Ab.1538.
- CHANG, F.M. y J. G. FLAKS (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 67, 1321.
- CHANG, F.M.; C. SIDDHIKOL y B. WEISBLUM (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 146.
- DELAUNAY, J.; C. MATHIEU y G. SHAPIRA (1972) *Eur. J. Biochem.* 31, 564.
- DONNER, D. y C. G. KURLAND (1972) *Mol. Gen. Genetics*. 115, 49.
- DUBNOFF, J. S. y U. MAITRA, (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 318.
- EBEL, J. P. (1973) EMBO Summer School, Spetzai (Grecia).
- EDSALL, J. T. y J. WYMAN, (1958) *Biophysical Chemistry*, Vol. 1, p. 591 Academic Press (N. York).
- FELNER, I. y K. SCHENKER (1970) *Helv. Chim. Acta*, 53, 754.
- FELLNER, P. (1971) *Biochimie*, 53, 573.
- FERNANDEZ-MUÑOZ, R. (1971) Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Madrid, p. 33-62.
- FERNANDEZ-MUÑOZ, R.; R. E. MONRO, R. TORRES-PINEDO y D. VAZQUEZ, (1971) *Eur. J. Biochem.*, 23 185.
- FERNANDEZ-MUÑOZ, R.; R. E. MONRO y D. VAZQUEZ, (1971) *Methods in Enzymology*, ed. L. Grossman y K. Moldave, vol. 20, p. 481.
- FERNANDEZ-MUÑOZ, R. y D. VAZQUEZ (1973a) *J. Antibiotics*, 26, 107.

- FERNANDEZ-MUÑOZ, R. y D. VAZQUEZ (1973b) Mol. Biology Reports, 1, 27.
- FETZ, E.; B. BOHNER y Ch. TAMM (1965) Helv. Chim. Acta, 48, 1669.
- FOX, J.J.; Y. KUWADA y K.A. WATANABE (1968) Tetrahedron Lett., 57, 6029.
- FOX, J.J.; Y. KUWADA; K.A. WATANABE; T. UEDA y E.B. WHIPPLE, (1964) Antim. Agents & Chemotherapy 518.
- FOX, J.J.; K.A. WATANABE y A. BLOCH (1966) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 5, 251.
- FREEMAN, G.G.; J.E. GILL y W.S. WARING (1959) J. Chem. Soc. 1105.
- FREEMAN, G.G. y J. MORRISON, (1948) Nature, 162, 30.
- FREEMAN, G.G. y J. MORRISON, (1949) Biochem. J. 44, 1.
- GARDOCKI, J.F.; E.K. TIMMENS; L.B. WILSON; J.O. SODERGREN; B.R. HETTINGER y S.Y. PAN (1955) Ant & Chem., 5, 490.
- GESTELAND, R.F. (1966) J. Mol. Biol. 18, 356.
- GODFREDSEN, W.O.; J.F. GROVE y CH. TAMM (1967) Helv. Chim. Acta, 50, 1666.
- GODFREDSEN, W.O. y S. VANGEDAL, (1964) Proc. Chem. Soc., 188.
- GODFREDSEN, W.O. y S. VANGEDAL, (1965) Acta Chem. Scand, 19, 1088.
- GOLDBERG, I.H. y K. MITSUGI, (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 453.
- GOLDBERG, I.H. y K. MITSUGI (1967) Biochemistry, 6, 383.
- GORDON, J. (1973) 9th I.U.B. Congress of Biochemistry, (Estocolmo) Abs. 133.
- GREEN, M.; y C.G. KURLAND (1971) Nature, 234, 273.

- GROLLMAN, A.P. (1967) J. Biol. Chem. 242, 3226.
- GRONER, Y. y M. REVEL (1973) J. Mol. Biol., 74, 407.
- GRUNBERG-MANAGO, M.; J.C. RABINOWITZ; J. DON-
DON; J.C. LELONG y F. GROS (1971) Fed. Eur.
Biochim. Soc. Lett., 19, 193.
- GUTZWILLER, J.; R. MAULI; H.P. SIGG y CH. TAMM,
(1964) Helv. Chim. Acta, 47, 2234.
- GUTZWILLER, J. y CH. TAMM (1965b) Helv. Chim. Acta,
48, 177.
- GYMESI, J. (1967) Tetrahedron Lett., 1665.
- HAENNI, A.L. y F. CHAPEVILLE, (1966) Biochim.
Biophys. Acta, 114, 135.
- HAMEL, E.; M. KOKA y T. NAKAMOTO, (1972) J.
Biol. Chem., 247, 805.
- HAMEL, E. y T. NAKAMOTO (1972) J. Biol. Chem. 247,
6810.
- HANSEN, B.S. y M.H. VAUGHAN Jr. (1973) Fed.
Proceedings, 32, Abs. 1539.
- HARRI, E.; W. LOEFFLER; H.P. SIGG; H. STAHELIN;
CH. STOLL; CH. TAMM y D. WIESINGER (1962) Helv.
Chim. Acta, 45, 839.
- HARRIS, R. y S. PESTKA (1973) J. Biol. Chem., 248,
1168.
- HASELKORN, R. y L.B. ROTHMAN-DENES (1973)
Ann. Rev. Biochemistry, vol. 42 (en prensa).
- HELSER, T.L.; J. DAVIES; J.E. DAHLBERG (1971)
Nature New Biology 233, 12.
- HENSHAW, E.C. y J. LOEBENSTEIN (1970) Biochim.
Biophys. Acta, 199, 405.
- HEPPEL, L.A. (1967) Methods in Enzymology, ed. L.
Grossman y K. Moldave, vol. 12, p. 316.
- HEREDIA, C.F. y H.O. HALVORSON, (1966) Biochemistry,
5, 946.
- HERNER, A.F.; I.H. GOLBERG y L.B. COHEN (1969)
Biochemistry, 8, 1335.

- HIGHLAND, J.H.; J.BODLEY, J.GORDON, R.HASENBANK y G.STOFFLER (1973) Proc.Nat.Acad.Sci. USA. (en prensa).
- HIGHLAND, J.H.; J.BODLEY; E.OCHOSNER; J.GORDON, R.HASENBANK y G.STOFFLER (1973) 9th I.U.B. Congress of Biochemistry, (Estocolmo) Abs. 157.
- HINDLEY, J. y S.M.PAGE (1972) Fed.Eur.Biochim.Soc. Lett., 26, 157.
- HOUSMAN, D.; M.JACOBS-LORENA; U.L.RAJBHANDARY y H.F.LODISH, (1970) Nature, 227, 913.
- IWASAKI, H. (1962) Yakag.Zasshi, 82, 1358.
- JIMENEZ, A.; R.E.MONRO y D.VAZQUEZ (1970) Fed. Eur.Biochim.Soc.Lett., 7, 103.
- KAEMPFER, R. (1971) Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 68, 2458.
- KALTSCHMIDT, E. y H.G.WITTMANN (1970) Anal. Biochem., 36, 401.
- KANZAKI, T.; E.HIGASHIDE; H.YAMAMOTO; M.SHIBATA; K.NAKAZAWA, H.IWASAKI, T.TAKEWAKA y A.MIYAKE (1962) J.Antibiotics, 15, 93.
- KIMURA, T. y K.OHTA (1973) Nature New Biology, 243, 199.
- KING, H.W.S.; H.J.GOULD y J.J.SHEARMAN (1971) J.Mol.Biol. 61, 143.
- KINOSHITA, T.; N.TANAKA y H.UMEZAWA (1970) J. Antibiotics, 23, 288.
- KISKA, K.; W.MOLLER y G.STOFFLER (1971) Nature, 233, 62.
- KUECHLER, E.; A.P.CZERNILOFSKY; E.COLLATZ y G.STOFFLER (1973) 9th I.U.B. Congress of Biochemistry (Estocolmo) Abs. 158.
- KURLAND, C.G.; D.DONNER; J.van DUIN; M.GREEN, L.LUTTER; L.RANDALL-HAZELBAUER, H.W.SHAUP y H.ZEICHHARDT, (1972) Proceedings of 8th FEBS Meeting (Amsterdam) Vol.27, p.225.

- KURLAND, C.G.; L.C. LUTTER y U. BODE, (1973) 9th I.U.B. Congress of Biochemistry (Estocolmo) Abs. 132.
- KURLAND, C.G.; P. VOYNOW; S.J.S. HARDY; L. RANDALL y L. LUTTER (1969) Cold Spring Harb. Quant. Biology, 34, 17.
- LEDER, P. y H. BURSZRYN, (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun., 25, 232.
- LENNOX, E.S. (1955) Virology 1, 190.
- LOCKWOOD, A.H.; P.R. CHAKRABORTY y U. MAITRA (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 3122.
- LUCAS-LENARD, J. y F. LIPMAN, (1971) Ann. Rev. Biochemistry, 40, 409.
- LYNCH, J.E.; A.R. ENGLISH; H. BAUCK y H. DELIGIANIS (1954) Ant. & Chem. 844.
- MADEN, B.E.H. (1971) Progress in Biophysics and Mol. Biology. Vol. 22, p. 127 (Ed. J.A. Butler y D. Noble), Pergamon Press, (Oxford y N. York).
- MAO, J.C.H. y M. PUTTERMAN (1969) J. Mol. Biol. 44, 347.
- MARSH, R.C. y A. PARMEGGIANI (1973) 9th I.U.B. Congress of Biochemistry (Estocolmo) Abs. 157.
- Mc PHAIL, A.T. y G.A. SIM (1966) J. Chem. Soc., 1394.
- MESHI, T. y T. TAKAHASI (1962) Bull. Chem. Soc. Japan, 35, 1501.
- MILLER, D.L. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 752.
- MILLER, M.J. y A.J. WAHBA (1973) J. Biol. Chem. 248, 1084.
- MIRAULT, M.E. y K. SCHERRER (1972) Proceedings of 8th FEBS Meeting (Amsterdam) Vol. 27, p. 197.
- MODELELL, J.; B. CABRER; A. PARMEGGIANI y D. VAZQUEZ (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1796.
- MODELELL, J.; B. CABRER y D. VAZQUEZ (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA (en prensa).

- MODELELL, J.; D. VAZQUEZ, (1973) J. Biol. Chem. 248, 488.
- MODELELL, J.; D. VAZQUEZ y R. E. MONRO (1971) Nature New Biology, 230, 109.
- MONIER, R. y P. GRAZ (1972) Proceedings of 7th FEBS Meeting (Varna) Vol. 23, p. 85.
- MONRO, R. E. (1967) J. Mol. Biol. 26, 147.
- MONRO, R. E.; M. L. CELMA y D. VAZQUEZ (1969) Nature, 222, 356.
- MONRO, R. E.; J. CERNA y K. A. MARCKER (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61, 1042.
- MONRO, R. E. y K. A. MARCKER (1967) J. Mol. Biol. 25, 347.
- MONRO, R. E. y D. VAZQUEZ (1967) J. Mol. Biol. 28, 161.
- MOORE, P. B. (1971) J. Mol. Biol. 60, 169.
- MORA, G.; D. DONNER; P. THAMMANA; L. LUTTER y C. G. KURLAND (1971) Mol. Gen. Genetics, 112, 229.
- MORGAN, J. y R. BRIMACOMBE (1973) Eur. J. Biochem. 37, 472.
- MULLOCK, B. M.; R. H. HINTON; M. DOBROTA; D. FROMBERG y E. REID (1971) Eur. J. Biochem., 18, 485.
- NETH, R.; G. HELLER y J. H. MATTHAEI, (1968) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349, 1514.
- NETH, R.; R. E. MONRO; G. HELLER; E. BATTANER y D. VAZQUEZ (1970) Fed. Eur. Biochim. Soc. Lett. 6, 198.
- NIERHAUS, K. H. y V. MONTEJO (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 1931.
- NIERHAUS, D. y K. H. NIERHAUS (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 1588.
- NISHIZUKA, Y. y F. LIPMANN (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 212.

- NOMBELA, C. y S.OCHOA (1973) Proc.Nat.Acad. Sci. USA (en prensa).
- NOMURA, M. (1970) Bact.Reviews, 34, 228.
- NOMURA, M. y V.A.ERDMANN (1971) Nature, 228, 744.
- NOMURA, M.; S.MISHUZIMA; M.OZAKI; P.TRAUT y C.V.LOWRY (1969) Cold Spring Harb.Symp.Quant. Biology, 34, 49.
- OHTSUBO, K.; P.KADEN y C.MITTERMAYER (1972) Biochim.Biophys.Acta, 287, 520.
- OIDA, S. y E.OHKI, (1968) Chem.Pharm.Bull, 16, 2086.
- OTAKA, E.; T.ITOH; S.OSAWA; K.TANAKA y M. TAMAKI, (1971) Mol.Gen.Genetics, 114, 4.
- PESTKA, S., (1969) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 64, 709.
- PESTKA, S. (1970a) Arch.Biochem.Biophys., 136, 80.
- PESTKA, S. (1970b) Arch.Biochem.Biophys., 136, 89.
- PESTKA, S. (1971a) Ann.Rev.Microbiology, 25, 487.
- PESTKA, S. (1971b) Methods in Enzymology, ed.L. Grossman y K.Moldave, vol. 20, p.502.
- PESTKA, S. (1972a) J.Biol.Chem., 247, 4669.
- PESTKA, S. (1972b) Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 69, 624.
- PESTKA, S.; H.ROSENFELD; R.HARRIS y H.HINTIKKA (1972) J.Biol.Chem., 247, 6895.
- PETTERMAN, M.L. (1964) The Physical and Chemical Properties of Ribosomes. Elsevier (Amsterdam).
- PFAFFLI, P. y CH.TAMM (1969) Helv.Chim.Acta, 52, 1911.
- PLANTA, R.J.; R.C.Van der BOS y J.KLOOTWIJK, (1972) Proceedings of 8th FEBS Meeting (Amsterdam) Vol.27, p.183.
- POLLACK, M.S. y C.A.PRICE (1971) Anal.Biochem. 42, 38.
- PONGS, O.; R.BALD y V.A.ERDMANN (1973) Proc. Nat.Acad.Sci.USA, 70, 2229.

- RANDALL-HAZELBAUER, L.L. y C.G.KURLAND
(1972) Mol.Gen.Genetics, 115, 234.
- REBOUD, A.M.; M.BUISSON; M.J.AMOROS y J.P.
REBOUD (1972) Biochem.Biophys.Res.Comm., 46,
2012.
- RICHMAN, N. y J.W.BODLEY (1972) Proc.Nat.Acad.
Sci.USA, 69, 686.
- RICHTER, D., (1972) Biochem.Biophys.Res.Comm.,
46, 1850.
- RICHTER, D. (1973) J.Biol.Chem. 248, 2853.
- RUDLAND, P.S.; W.A.WHYBROW y B.F.C.CLARK
(1971) Nature New Biology, 231, 76.
- SABOL, S.; M.A.G.SILLERO; K.IWASAKI y S.OCHOA,
(1970) Nature, 228, 1269.
- SABOL, S. y S.OCHOA (1971) Nature New Biology,
234, 233.
- SANDER, G.; R.C.MARSH y A.PARMEGGIANI (1972)
Biochem.Biophys.Res.Comm., 47, 866.
- SCATCHARD, G. (1949) Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660.
- SCHAUP, H.W.; M.GREEN y C.G.KURLAND (1971)
Mol.Gen.Genetics, 112, 1.
- SCHAUP, H.W. y C.G.KURLAND (1972) Mol.Gen.
Genetics, 114, 350.
- SCHOL-SCHWARZ, B. (1965) Trans.Brit.Mycol.Soc.
48, 51.
- SCHRIER, P.I.; J.A.MAASSEN y W.MOLLER (1973)
Biochem.Biophys.Res.Comm., 53, 90.
- SENIOR, B.W. y I.B.HOLLAND (1971) Proc.Nat.Acad.
Sci.USA 68, 959.
- SHELTON, K.R. y J.M.CLARK (1967) Biochemistry, 6
2735.
- SHERTON, C.C. y I.G.WOOL (1972) J.Biol.Chem. 247,
4460.
- SINGER, S.J. (1967) Adv.in Prot.Chem. 22, 1.

- SINOHARA, H. y H.H. SKY-Peck (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18, 98.
- SMITHERS, D.; L.L.BENNETT y R.F.STRUCK (1969) *Mol. Pharmacology*, 5, 433.
- SNATAKE, G. y CH.TAMM (1967) *Helv. Chim. Acta*, 50, 1618.
- SOBIN, B.A. y F.TANNER (1954) *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4053.
- SONENBERG, N.; M.WILCHEK y A.ZAMIR (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 1423.
- SOPORI, M. y P.LENGYEL (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, 238.
- SPIRIN, A.S. (1969) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biology*, 34, 197.
- SPIRIN, A.S. y L.P.GAVRILOVA (1969) *The Ribosome*. Springer-Verlag (N.York, Berlin).
- STAEHELIN, T.; D.MAGLOTT y R.E.MONRO (1969) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biology*, 34, 39.
- STOFFLER, G.; L.DAYA; K.H.RAK y R.A. GARRET, (1971) *J. Mol. Biol.*, 62, 411.
- STOFFLER, G. y H.G.WITTMANN, (1971a) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 2283.
- STOFFLER, G. y H.G.WITTMANN (1971b) *J. Mol. Biol.* 62, 407.
- STOFFLER, G.; H.ZEICHHARDT y R.HASSENBANK (1973) *Mol. Gen. Genetics*, (en prensa).
- SUBRAMANIAN, A. y B.D.DAVIS (1970) *Nature*, 228, 1273.
- SUHADOLNIK, R.J. (1970) *Nucleoside Antibiotics*, Wiley Interscience, (N.York).
- TANAKA, K.; M.TAMAKI; T.ITOH; E.OTAKA y S. OSAWA (1971) *Mol. Gen. Genetics*, 114, 23.
- TANNER, F.W.; B.A.SOBIN y J.GARDOCKI (1954/55). *Antibiotics Annual*, 809.

- TATE, W.P.; A.L.BEAUDET y C.T.CASKEY (1973) Proc.Nat.Acad.Sci. USA, (en prensa).
- TATE, W.P. y C.T.CASKEY (1973) J.Biol.Chem. (en prensa).
- TERHOST, C.P.; (1973) Tesis Doctoral. Universidad de Leiden (Holanda).
- TERHORST, C.P.; W.MOLLER; R.LAURSEN y B. WITTMANN-LIEBOLD (1973) Eur.J.Biochem. 34, 138.
- THAMMANA, P.; C.G.KURLAND; E.DEUSSER; J. WEBER; R.MASCHLER; G.STOFFLER y H.G. WITTMANN (1973) Nature New Biology, 242, 49.
- TRAUB, P. y M.NOMURA (1968) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 59, 777,
- TRAUT, R.R.; H.DELIVS; C.AHMAD-ZADEH; T.A. BICKLE; P.PEARSON y A.TISSIERES (1969) Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biology, 34, 25.
- TRAXLER, P. y CH.TAMM (1970) Helv.Chim.Acta, 53 1846.
- TSUNODA, H.; N.TOYAZAKI; N.MOROOKA; N.NAKANO; H.YOSHIYAMA; K.OKUBO y M.ISODA (1968) Proc.Food.Res.Inst., 23, 89.
- UENO, Y.; M.HOSOYA; Y.MORITA; I.UENO y T.TATSUNO (1968) J.Biochem., 64, 479.
- UENO, Y.; I.UENO; T.TATSUNO; K.OHOKUBO y H. TSUNODA (1969) Experientia, 25, 1062.
- Van DUIN, J. y C.G.KURLAND (1970) Mol.Gen.Genetics, 109, 169.
- Van DUIN, J.; P.H.Van KNIPPENBERG; M.DIEBEN y C.G.KURLAND (1972) Mol.Gen.Genetics, 116, 181.
- VAZQUEZ, D. (1964) Nature, 203, 257.
- VAZQUEZ, D. (1966) Biochim.Biophys.Acta, 114, 277.
- VAZQUEZ, D. (1967) Antibiotics I.Mecanism of Action, (ed.D.Gottlieb y P.D.Shaw) p.387. Springer-Verlang (N.York, Berlin).

- VAZQUEZ, D.; E. BATTANER; R. NETH; G. HELLER y R. E. MONRO (1969a) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biology, 34, 369.
- VAZQUEZ, D.; T. STAEHELIN; M. L. CELMA; E. BATTANER; R. FERNANDEZ-MUÑOZ y R. E. MONRO (1969b) Proceedings of 6th FEBS Meeting (Madrid) Vol. 21, p.109.
- VERMEER, C.; R. J. KIEVIT; W. J. Van ALPHEN y L. BOSCH, (1973) Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 31, 273.
- VERMEER, C.; J. TALENS; H. BLOEMSMA-JONKAN y L. BOSCH (1971) Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 19, 201.
- VOGEL, Z.; A. ZAMIR y D. ELSON (1969) Biochemistry, 8, 5161.
- VOURNAKIS, J. y A. RICH (1972) Proceedings of 7th FEBS Meeting (Varna) Vol. 23, p.287.
- WARNER, J. R. (1971) J. Biol. Chem. 246, 447.
- WATANABE, K. A.; M. P. KOTICK y J. J. FOX (1970) J. Org. Chem. 35, 231.
- WATSON, J. D. (1964) Bull. Soc. Chem. Biol. 46, 1399.
- WEISBLUM, B. y J. DAVIES (1968) Bact Reviews, 32, 493.
- WELFLE, H.; J. STAHL y H. BIELKA (1971) Biochim. Biophys. Acta, 243, 416.
- WESTERMANN, P.; H. BIELKA y M. BOTTGER (1971) Mol. Gen. Genetics, 111, 224.
- WETTENHALL, R. E. H.; I. G. WOOL y C. C. SHERTON, (1973) Biochemistry, 12, 2403.
- WILZBACH, K. E. (1957) J. Amer. Chem. Soc. 79, 1013.
- WITTMAN, H. G.; G. STOFFLER; I. HINDENNOCH, C. G. KURLAND; L. RANDALL-HAZELBAUER; E. A. BIRGE, N. NOMURA; E. KALTSCHMIDT; S. MIZUSHIMA; R. R. TRAUT y T. A. BICKLE (1971) Mol. Gen. Genetics, 111, 327.
- WONG, C. M. (1968) Can. J. Chemistry, 46, 1101.
- ZAGORSKI, L.; J. DONDON; J. E. LELONG; F. GROS y M. GRUNBERG-MANAGO; (1971) Biochimie, 53, 63.

ZWEIG, G. y J.R. WHITAKER. Paper Chromatography and Electrophoresis in Stabilizing Media. (1971) Vol. 2: Paper Chromatography. Academic Press. (N.York).

APENDICES

APENDICE I

RESUMEN DE LAS CONDICIONES IONICAS EMPLEADAS

1. OBTENCION DE RIBOSOMAS

1.A. S.cerevisiae

| | | |
|--------------------|-------------------------|--------|
| BSY (standard) | TRIS-CIH | 10 mM |
| | Cl ₂ Mg | 5 mM |
| | Ac NH ₄ | 50 mM |
| | 2-ME | 5 mM |
| BLY (lavado) | TRIS-CIH | 20 mM |
| | Cl ₂ Mg | 100 mM |
| | Ac NH ₄ | 500 mM |
| | 2-ME | 5 mM |
| BRY (conservación) | Maleato NH ₄ | 50 mM |
| | Cl ₂ Mg | 5 mM |
| | 2-ME | 5 mM |
| | | |

1.B. Amígdalas palatinas humanas

| | | |
|-----------------------|--------------------|--------|
| BHH (homogeneización) | TRIS-CIH | 50 mM |
| | Cl ₂ Mg | 5 mM |
| | ClK | 25 mM |
| | 2-ME | 7 mM |
| | Sacarosa | 250 mM |
| BLH (lavado) | TRIS-CIH | 50 mM |
| | Cl ₂ Mg | 10 mM |
| | ClK | 500 mM |
| | Sacarosa | 250 mM |
| BRH (conservación) | TRIS-CIH | 50 mM |
| | Cl ₂ Mg | 5 mM |
| | ClK | 25 mM |
| | 2-ME | 7 mM |

1.C. E.coli

| | | | |
|---|------------------------------|--------------------|---------|
| A | (standard y conservación) | TRIS-ClH | 10 mM |
| | | Ac ₂ Mg | 10 mM |
| | | AcNH ₄ | 100 mM |
| | | 2-ME | 5 mM |
| B | (lavado) | TRIS-ClH | 20 mM |
| | | Ac ₂ Mg | 20 mM |
| | | AcNH ₄ | 1000 mM |
| | | 2-ME | 5 mM |

2. EXPERIMENTOS DE FIJACION DE ANTIBIOTICOS
A RIBOSOMAS DE :2.A. S.cerevisiae

| | | | |
|-----|------------|-------------------------|-----------|
| BFY | (standard) | Maleato NH ₄ | 50 mM |
| | | Cl ₂ Mg | 12 mM |
| | | 2-ME | 5 mM |
| | | | |
| FRY | (etanol) | TRIS-ClH | 50 mM |
| | | Cl ₂ Mg | 20 mM |
| | | ClK | 400 mM |
| | | Etanol | 33% (v/v) |

2.B. Amígdalas palatinas humanas

| | | | |
|-----|------------|--------------------|-------|
| BFH | (standard) | TRIS-ClH | 50 mM |
| | | Cl ₂ Mg | 11 mM |
| | | ClK | 60 mM |
| | | 2-ME | 7 mM |

3.B. E.coli

| | | | |
|--------|------------|----------------------------|--------|
| BFB | (standard) | TRIS-ClH | 33 mM |
| | | Cl ₂ Mg | 13 mM |
| | | ClK | 270 mM |
| BFB(E) | (etanol) | Idem pero Etanol 33% (v/v) | |

3. ENSAYOS

3.A. S.cerevisiae

| | |
|------------------------------|-----|
| Síntesis de polifenilalanina | BFY |
| Reacción de la puromicina | BFY |
| Reacción del fragmento | FRY |

3.B. Amígdalas palatinas humanas

| | |
|------------------------------|-----|
| Síntesis de polifenilalanina | BFH |
|------------------------------|-----|

3.C. E.coli

| | | |
|------------------------------|--------------------|-------|
| Síntesis de polifenilalanina | TRIS-ClH | 50 mM |
| | Cl ₂ Mg | 12 mM |
| | ClK | 30 mM |
| Reacción de la puromicina | BFB | |
| Reacción del fragmento | BFB (E) | |

4. OTROS

| | | |
|--|--------------------|--------|
| Subunidades de levadura (BDY) | TRIS-ClH | 50 mM |
| | Cl ₂ Mg | 4 mM |
| | ClK | 400 mM |
| | 2-ME | 20 mM |
| Disociación ribosomas <u>E.coli</u> | TRIS-ClH | 20 mM |
| | Cl ₂ Mg | 1 mM |
| | Ac NH ₄ | 500 mM |
| | 2-ME | 5 mM |
| Fijación de N-Ac- ¹⁴ C Fen- tRNA a ribosomas de levadura | TRIS-ClH | 50 mM |
| | Cl ₂ Mg | 20 mM |
| | Ac NH ₄ | 100 mM |

El TRIS-ClH fué siempre empleado a pH 7,4 y el maleato amónico a pH 6,5.

APENDICE II

SOLUCIONES TAMPON

1. ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE

| | | |
|---------------|---------------------------|-----------------------|
| pH 2,0 | Ac. fórmico (2%) | - ac. acético (7,5%) |
| pH 2,8 | Ac. fórmico (1%) | - amoniaco |
| pH 3,7 | Ac. fórmico (50 mM) | - amoniaco |
| pH 6,0 | Piridina (1,75%) | - ac. acético (0,25%) |
| pH 6,0 | Piridina (5%) | - ac. acético |
| pH 5,5 - 7,6 | Cacodilato sódico (50 mM) | - ClH |
| pH 7,2 - 8,6 | TRIS (50 mM) | - ClH |
| pH 8,4 - 9,6 | Trietanolamina (50 mM) | - ClH |
| pH 9,5 - 10,5 | Etanolamina (50 mM) | - ClH |

2. GRADIENTES DE CROMATOGRAFIA EN COLUMNAS

Carboximetil-celulosa:

Carbonato amónico (pH 8,6) 2 mM - 50 mM

Fosfo-celulosa:

Formiato amónico (pH 2,8) 0,15 M - 1 M (NH_4^+)

DEAE-Sephadex:

Formiato amónico (pH 5,0) 0,1 M - 1 M (HCOO^-)

APENDICE III

SOLVENTES CROMATOGRAFICOS

1. PURIFICACION ^3H ANISOMICINA

1. sec-butanol:bencina de petroleo ($40-60^{\circ}\text{C}$):
amoniaco 2N (25:5:4).
2. n-butanol:agua:ácido acético (60:10:3)
3. Etanol:agua (1:1) en atmósfera de cloroformo

2. PURIFICACION ^3H GOUGEROTINA

- I. Terc-butanol:metil etil cetona:agua:amoniaco
(4:3:2:1).
- II. Amoniaco:n-butanol:n-propanol:etanol:agua
(9:8:8:2:2).
- III. n-butanol:ac.fórmico:n-propanol:ac.tricloro-
acético:agua:acetona (10:5:5:4:4:2).
- IV. Metanol:isopropanol:amoniaco:agua (9:6:3:2).
- V. Agua: n-propanol:amoniaco (90:10:1).
- VI. Acetonitrilo:acetato amónico 0,1 M (7:3).

3. PURIFICACION ^{14}C TRICODERMINA

1. Benceno:acetato de etilo:pentano (4:1:1).
2. Isooctano:butanol (5:1).

APENDICE IV

ESTUDIOS DE FIJACION. PARAMETROS

1. ^3H ANISOMICINA— 80S *S.cerevisiae*, BFY, 0°C

$$K_{d1}^{0^\circ\text{C}} = 4,3 \times 10^{-7} \text{ M}; K_{d2}^{0^\circ\text{C}} = 5,8 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$n_1 = 0,28 \quad ; \quad n_2 = 0,56$$

— 80S *S.cerevisiae*, BFY, 30°C

$$K_{d1}^{30^\circ\text{C}} = 1,2 \times 10^{-6} \text{ M}; K_{d2}^{30^\circ\text{C}} = 6,6 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$n_1 = 0,37 \quad ; \quad n_2 = 0,43$$

— 80S *S.cerevisiae*, FRY, 0°C

$$K_d^{\text{EtOH}} = 3,6 \times 10^{-6} \text{ M}; n = 0,41$$

— 60S *S.cerevisiae*, BFY, 0°C

$$K_d^{60\text{S}} = 1,7 \times 10^{-6} \text{ M}; n = 0,67$$

— 60S + 40S *S.cerevisiae*, BFY, 0°C

$$K_{d1}^{\text{R}} = 5,7 \times 10^{-7} \text{ M}; K_{d2}^{\text{R}} \simeq 5,6 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$n_1 = 0,35 \quad ; \quad n_2 \simeq 0,48$$

— 80S *S.cerevisiae* (80S \rightleftharpoons 60S + 40S), BFY, 0°C

$$K_{d1}^{\text{D y R}} = 5,0 \times 10^{-7} \text{ M}; K_{d2}^{\text{D y R}} \simeq 8 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$n_1 = 0,36 \quad ; \quad n_2 \simeq 0,44$$

— 80S Humanos, BFH, 0°C

$$K_{d1}^{HT} = 1,6 \times 10^{-6} \text{ M} ; K_{d2}^{HT} = 6,6 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$n_1 = 0,37 ; n_2 = 0,35$$

2. ³H GOUGEROTINA

— 80S S.cerevisiae, BFY, 0°C

$$K_{d1}^{80S} = 9,1 \times 10^{-7} \text{ M} ; K_{d2}^{80S} = 1,2 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$n_1 = 0,28 ; n_2 = 0,58$$

— 80S S.cerevisiae, BFY, 30°C. Estimativa

$$K_d^{80S} (30^\circ\text{C}) \simeq 4 \times 10^{-4} \text{ M}$$

— 80S S.cerevisiae, FRY, 0°C. Estimativa

$$K_d^{80S} (\text{EtOH}) \simeq 7 \times 10^{-6} \text{ M}$$

— 70S E.coli, BFB, 0°C

$$K_d^{70S} = 1,5 \times 10^{-6} \text{ M} ; n = 0,7$$

— 70S E.coli, BFB, 30°C. Estimativa

$$K_d^{70S} (30^\circ\text{C}) \simeq 6 \times 10^{-6} \text{ M}$$

— 70S E.coli, BFB(E), 0°C. Estimativa

$$K_d^{70S} (\text{EtOH}) \simeq 4 \times 10^{-6} \text{ M}$$

— 50S E.coli, BFB(E), 0°C. Estimativa

$$K_d^{50S} (\text{EtOH}) \simeq 6 \times 10^{-6} \text{ M}$$

— 50S + 30S + tRNA^{Fen}. E.coli, BFB, 0°C. Estimativa

$$K_d^R (+tRNA^{Fen}) \simeq 2,7 \times 10^{-6} \text{ M}$$

3. ¹⁴C TRICODERMINA

— 80S S.cerevisiae, BFY, 0°C

$$K_d^Y = 1,8 \times 10^{-6} \text{ M}; n = 0,9$$

— 80S S.cerevisiae, BFY, 0°C. Indirecta

$$K_d^Y(\text{ind.}) = 2,1 \times 10^{-6} \text{ M}$$

— 80S Humanos, BFH, 0°C

$$K_d^{HT} = 6,7 \times 10^{-7} \text{ M}; n = 0,73$$

4. OTRAS DETERMINACIONES (INDIRECTAS)

Desacetilanisomicina. - 80S, S.cerevisiae, BFY, 0°C.

$$K_d^Y (\text{DAN}) = 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Acido tenuazónico. - 80S, Humanos, BFH, 0°C.

$$K_d^{HT} (\text{TNA}) = 2.2 \times 10^{-5} \text{ M}$$